

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB-BLIDA



FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUE
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Mémoire de Fin d'Étude en vue de l'obtention

Du diplôme de Master en Sciences de La Nature et de La Vie

Option : Sciences Alimentaires

***PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS DES COMPOSÉS
PHÉNOLIQUES DE DEUX VARIÉTÉS DE GRENADE (PUNICA GRANATUM L)
DE LA ZONE DE MITIDJA***

Présenté par : M^{LLE} BENZERROUK FATIMA ZOHRA

Devant le jury composé de :

Mr. HADJ SADOK. T	Maître de conférences B	USDB Président de jury
Mme. KOUIDRI . A	Maître Assistante A	USDB Examinatrice
Mr. KADRI	Maître de conférences A	USDB Examineur
Mme. KASSI .Z	Maître Assistante A	USDB Promotrice

Année Universitaire 2012/2013

Remerciements

Au premier lieu, je remercie Dieu qui m'a donnée la patience, la santé et la volonté pour pouvoir terminer ce travail.

Je tiens à remercier vivement tous ceux qui m'en aidé à élaborer cet ouvrage et en particulier ma promotrice M^{me}. KACI ZOUBIDA, Maitre assistante à l'université de Tizi Ouzou, qui a assuré la gestion quotidienne de ma thèse, je la remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle avait consentis durant la rédaction et ces orientations précieuses

Je tiens également à remercier les membres de jury, pour l'honneur qu'ils m'ont accordé en acceptant de juger mon travail.

Je remercie aussi l'ensemble des enseignants de faculté d'agronomie qui ont contribué à notre formation, sans oublier tout le personnel du laboratoire de l'ANTIBIOTICAL -Groupe SAIDAL. Médéa.

Que tous ceux ou celles qui m'ont apportés leur soutien et qui m'ont aidé de loin ou de près pour l'achèvement de ce travail trouve ici l'expression de ma vive et sincère reconnaissance, en particulier mes parents, ma familles et mes amies qui sont présentées à mes côtés dans les plus difficiles moments.

Dédicace :

*C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail
aux personnes qui me sont les plus chères au monde.*

*A la lumière de ma vie, ma très chère mère, **HAMADOUCHE
OUARDIA** pour son amour et ses sacrifices sans limites
consentis à mon égard ; qu'elle trouve en ces quelques mots le
témoignage de ma profond affection.*

*A mon cher père **BOUBAKEUR**, avec toute ma
reconnaissance, mon affection et mon respect.*

*A ma sœur **SARAH** et mon frère **Rédha** et **toute ma famille** pour
leur amour indéfectible et leur soutien moral.*

*A tous mes amis particulièrement **NADIA, ALI, KHADIDJA**,
et ma petite cousine **MAYA**.*

*A tous ce qui m'ont aidé et soutenu pendant tout mon cursus
universitaire.*

*Ce mémoire fait partie de la thèse doctorale de
madame KACI.*

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction Générale1

Première partie

Synthèses bibliographique

1.1 Étymologie.....	3
1.2. Origine et historique.....	3
1.3.Description botanique.....	4
1.4. Place du grenadier dans la systématique.....	7
1. 5.Répartition géographique et production.....	8
1.5.1.Dans le monde.....	8
1.5.2. En Algérie.....	10
1.6. Composition biochimique de la plante.....	11
1. 7.Composition phénoliques de la grenade.....	12
1.7.1 Composés phénoliques à faible poids moléculaire.....	12
1.7.2. Composés phénoliques à poids moléculaire élevé.....	12
1.8. Propriétés thérapeutiques de la grenade.....	13
1. 9.Utilisations de la grenade.....	13
1.9.1 Utilisation culinaire.....	13
1.9.2. Utilisation en industrie agroalimentaire.....	14
1.9.3.Utilisation en industrie cosmétique.....	14
1.9.3. Autres utilisations.....	14
Chapitre II : Structure et caractérisation des composés polyphénoliques	
2.1.Définition des composés phénoliques.....	15
2.2.Composés phénoliques dans la plante.....	16
2.2.1. Répartition cellulaire, tissulaire et dans les différents organes de la plante.....	16
2.3. Facteurs influençant la teneur des plantes en composés phénoliques.....	17
2.3.1. Facteurs physiologiques :.....	17

2.3.2. Facteurs génétiques :	17
2.3.3. Facteurs externes :	17
2.4. Principales formes et classes des composés phénoliques	18
2.4.1. Les formes simples :	18
2.4.1.1. Phénols simples	18
2.4.1.2.1 Les acides phénoliques simples	18
2.4.1.2.1. Acides hydroxybenzoïques	18
2.4.1.2.2. Acides hydroxycinnamiques	19
2.4.1.2.3 Coumarines	20
2.4.1.3. Les flavonoïdes	20
2.4.1.3.1 Généralités	20
2.4.1.3.2. Classification	21
2.4.1.3.3. Structure	22
2.4.1.3.4. Localisation	22
2.4.1.3.5. Distribution	23
2.4.2. Formes condensées	24
2.4.2.1. Les tannins	24
2.4.2.2. Les lignines	25
2.5. Rôles et Propriétés antioxydantes des polyphénols	25
2.5.1 Propriétés antiradicalaires	25
2.5.2. Propriétés chélatrices des ions métalliques	26
2.5.3. Propriétés antibactériennes	27
2.5.4. Propriétés anticancéreuses	28
2.5.5. Propriétés antivirales	28
2.6. Autres activités biologiques des composés phénoliques	29
2.7. Intérêts dans l'industrie agroalimentaire	30

Chapitre III : L'oxydation et les antioxydants

3.1 L'oxydation	31
3.1.2. Définition	31
3.1.3. Causes et conditions d'oxydation	31
3.2. Les antioxydants	32
3.2.1. Définition d'un antioxydant	32
3.2.2. Classification des antioxydants	32
3.2.2.1. Antioxydants naturels	32

3.2.2. 2.Les antioxydants de synthèse	33
3.2.2.3 Les antioxydants enzymatiques	33
3.3. Activité antioxydante des polyphénols	34
3.4. Le stress oxydatif	35
3.4.1. Historique :	35
3.4.2.Définition d'un radical libre	35
3.4.3. Rôle des radicaux libres	36
3.4.4.Définition du stress oxydant	36
3.4.5.Origine du stress oxydant :	37
3.4.6.Conséquences du stress oxydant	37
3.4.7 Les maladies liées au stress oxydant.....	38
3.5. Mécanisme d'action des antioxydants	39
3.6. Méthodes de mesure de l'activité antioxydante	40

Deuxième partie:

Etude Expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

1.1 Matériel végétal	42
1.1.1. Choix de la variété	42
1.1.2. Sites d'échantillonnage	42
1.2. Préparation de l'extrait	42
1.3.Méthodes d'analyses :	43
1.3.1.Caractérisation physico-chimiques	44
1.3.1.1. Détermination de la teneur en eau :	44
1.3.1.2.Détermination du pH	45
1.3.1.3. Détermination de la teneur en matière grasse.	45
1.3.1.4.Détermination de la teneur en cendres :	46
1.3.1.5.Dosage des sucres totaux :	47
1.3.1.6. Dosage des protéines brutes	48
1.4.Extraction des polyphénols :	50
1.4.1. Préparation de l'extrait brut méthalonique :	50
1.4.2.Rendement d'extraction :	52
1.5. Analyses des extraits des pelures du fruit <i>Punica Granatum L</i>	52
1.5.1.Réactions de caractérisations des composés phénoliques :	52
1.5.2. Techniques d'analyses.....	53

1.5.2.1. Analyse qualitative	53
1.5.2.2. Analyse quantitative	54
1.5.2.2.1. Estimation quantitative des polyphénols totaux	54
1.5.2.2.2. Estimation quantitative des flavonoïdes :	56
1.5.2.2.3. Estimation quantitative des Tanins hydrolysables	57
1.6. Évaluation de l'activité biologique des extraits végétaux étudiés	57
1.6.1. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante :	57
1.6.1.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH	58
1.6.1.2. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50)	61
1.7. Mesure du pouvoir réducteur.	61

Chapitre II : Résultats et discussion

2.1. Analyses physico-chimique :	64
2.1.1. Teneur en humidité :	64
2.1.2. pH	65
2.1.3 Teneur en lipide :	65
2.1.4. Teneur en cendres :	66
2.1.5. Teneur en Sucres totaux	66
2.1.6 .Teneur en protéine	66
2.2. Rendement d'extraction	67
2.3. Analyses des extraits des pelures de punica granatum L	69
2.3.1 Réactions de caractérisations des composés phénoliques	69
2.4. Techniques d'analyses	69
2.4.1. Analyse qualitative : chromatographie liquide à haute performance	69
2.4.2. Analyse quantitative	73
2.4.2.1. Teneur en polyphénols totaux	73
2.4.2.2. Teneur en flavonoïdes	75
2.4.2.3. Teneur en tannins hydrolysables	77
2.5 . Evaluation de l'activité biologique des extraits de plantes étudiées	80
2.5.1 Evaluation de l'activité antioxydante	80
2.5.1.1 Activité de piégeage du radical DPPH	80
2.5.2. Mesure du pouvoir réducteur	85

Conclusion Générale	88
Références Bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations :

AE	: Acétate d'éthyle
AlCl₃	:Chlorure d'aluminium
BHT	:butyl_hydroxy_anisole
(C)	: Concentration
CaCO₃	:Carbonate de calcium
DO	: Densité optique
DPPH	: 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl
EAG	:Equivalent acide gallique
EAT	:Equivalent acide tannique
EEG	:Extraitde l'écorce de la grenade
EP	:Extrait phénolique
EQ	:Equivalent quercetine
FAO	:Food and agricultural organization
FeCl₃	: Chlorure de fer
Gr	: Gramme
H	: heure
H₂SO₄	:Acide sulfurique
Ha	:Hectare
HCl	: Acide chlorhydrique
HDL	: Hight density lipoprotein
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance
IC₅₀	: Concentration inhibitrice réduisant 50% de la concentration du DPPH
INRAA	: Institut national de la recherche agronomique d'Algérie
Kg	: Kilogramme
KOH	: Hydroxyde de potassium
L	: Litre
Mg	: Milligramme
MgSO₄	: Sulfate de magnésium
ml	: Millilitre
MS	: Matière sèche
MV	: matière végétale
N	: Normalité

NT	: Azote total
NaOH	: Hydroxyde de sodium
NNP	: Azote non protéique
Ppm	: partie par million
OMS	: Organisation mondiale de la santé
UV	: Ultra violet
V	: Volume
µg	: Microgramme
µl	: Microlitre
%	: Pourcentage

Liste des tableaux

Tableau n°1 : variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie	10
Tableau n°2 : composition biochimiques de la grenade	11
Tableau n°3 : Principaux acides hydroxybenzoïques	19
Tableau n°4 : Principaux acides hydroxycinnamiques	19
Tableau n°5 : Principaux types de coumarines	20
Tableau n°6 : Principales classes des flavonoïdes	21
Tableau n°7 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes	23
Tableau n°8 :Principales activités biologiques des composées phénoliques	29
Tableau n°9 : description de quelques tests antioxydants in vitro	41
Tableau n°10 : composition biochimique du grenade(en % de la matière végétale).....	64
Tableau n°11 : Rendement en extraits méthanolique de quatre espèces de grenade (en % MS)	67
Tableau n°12 : rendement en extrait sec de peau de grenade rapporté par certains auteurs.....	68
Tableau n°13 : Temps de rétention des flavonoïdes standards.....	72
Tableau n°14 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans les extraits de grenade	72
Tableau n°15 : Teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique des différents échantillons de la peau de la grenade	74
Tableau n°16 : Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques de la grenade	77
Tableau n°17 : Teneur en tannins hydrolysables des extraits méthanoliques de la grenade	79
Tableau n°18 : Activité de piégeage du radical libre des extraits de <i>Punica granatum</i> comparée à celle du BHT	81
Tableau n°19 : Valeurs des IC ₅₀ , polyphénols totaux et flavonoïdes et des tanins hydrolysables différents extraits de la peau de la grenade	84
Tableau n°20 : Pouvoir réducteur des extraits de <i>Punica granatum</i> L comparé à celui du BHT	86
Tableau n°21 : Principales méthodes d'études des composées phénoliques (Annexes).	

Liste des figures

Figure n°1 : Arbre et planche illustrée taxonomique de <i>Punica granatum</i>	4
Figure n°2 : Feuilles de <i>Punica granatum</i>	5
Figure n°3 : Fleurs aux sépales charnus et rouges et aux pétales froissés.....	5
Figure n°4 : Grenades et leur calice denté	6
Figure n°5 : Grenade et ses nombreuses graines (Bartles A.,1998).....	6
Figure n°6 : Répartition géographique de la grenade (Wald E.,1982)	9
Figure n°7 : Composés phénoliques à faible poids moléculaire	12
Figure n°8 : Structure moléculaire de la punicalagine	13
Figure n°9 : Structure du phénol (noyau aromatique)	15
Figure n°10 : Structure de base des flavonoïdes	22
Figure n°11 : Schéma simplifié des flavonoïdes.....	22
Figure n°12 : pouvoir antioxydant des polyphénols	25
Figure n°13 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{+n}) (Tiqwari, 2001)	27
Figure n°14 : Rôle des enzymes antioxydantes dans le processus d'inactivation de l'ion superoxyde.....	34
Figure n°15 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques	39
Figure n°16 : diagramme générales des dosages effectuer	43
Figure n°17 : appareil à Soxhlet.....	46
Figure n°18 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux.....	48
Figure n°19 : évaporation du solvant (méthanol) au Rotavapor	51
Figure n°20 : Lyophilisation de l'extrait méthanolique de la grenade.....	51
Figure n°21 : Formule semi-développée de l'acide gallique (acid 3, 4,5 trihydroxybenzoïque)	55
Figure n°22 : formule chimique de la quercétine	56
Figure n°23 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2 Diphenyl-1-Pikryl- Hydrazyle)	59
Figure n°24 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	59
Figure n°25 : Solution de DPPH après réaction avec l'extrait phénolique	60
Figure n°26 : Les étapes d'évaluation du pouvoir réducteur	68
Figure n°27 : Chromatogramme d'HPLC de la quercétine enregistré à 254 nm.....	70
Figure n°28 : Chromatogramme d'HPLC de la rutine enregistré à 254 nm	70

Figure n°29 : Chromatogramme d'HPLC de la catéchine enregistré à 254 nm	70
Figure n°30 : Chromatogramme d'HPLC d'extrait de Doux de koléa enregistré à 254nm.....	71
Figure n°31 : Chromatogramme d'HPLC d'extrait de Doux de Messad enregistré à 254 nm	71
Figure n°32 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique	73
Figure n°33 : teneur en polyphénols totaux des extrais méthaloniques étudiées de la peau de la grenade	74
Figure n°34 : Courbe d'étalonnage de la quercétine	76
Figure n°35 : Teneur en flavonoïdes des extraits méthaloniques de la peau de la grenade	76
Figure n°36 : courbe d'étalonnage de l'acide tannique	78
Figure n°37 : Teneur tanins hydrolysables des extraits méthaloniques de la peau de la grenade	78
Figure n°38 : balayage du DPPH.....	80
Figure n°39 : Activité de piégeage du radical libre par les extraits de Doux de Koléa et Doux de Messad et du BHT	81
Figure n°40 : Concentrations pour 50% d'inhibition des radicaux libres, du BHT et des extraits méthalonique de <i>Punica granatum</i>	83
Figure n°41 : Pouvoir réducteur du BHT et des deux extraits méthaloniques de <i>Punica granatum</i> en fonction de la concentration	86

Résumé :

Dans la présente étude nous avons tenté à effectuer des analyses physico-chimiques et d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des écorces de deux variétés de la grenade (*Punica granatum L*) de la région de la Mitidja, et une analyse qualitative par HPLC.

la détermination des teneurs en métabolites primaires révèle les compositions suivantes : sucre totaux (4,27%et 3,46%), protéines 0,55% et lipides (0,52%, 0,95%) pour l'extrait de Doux de Koléa et de Doux de Messad respectivement.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu) montrent les teneurs suivantes :(642,58 et 726,75 mg EAG/g extrait), des flavonoïdes totaux (par la méthode au trichlorure d'aluminium) (22,67 et 20,04mg EQ/g extrait) et des tanins hydrolysables (271,25 et 314,25mgEAT/g extrait) pour la variété de Doux de Koléa et Doux de Messad respectivement.

Le présent travail a montré l'activité anti-oxydante par le biais de deux méthodes : la méthode du pouvoir réducteur et la méthode au DPPH montre que l'extrait de doux de koléa et Messad sont les plus actifs, avec une IC50 de l'ordre de12,83 mg/l et 12.96 mg /l respectivement ,en comparant avec celle du BHT avec une IC50 (28,01). L'analyse qualitative des extraits par chromatographie liquide à haute performance a révélé la présence probable de la quercétine et la catéchine dans les deux extraits méthaloniques des deux variétés.

Mots clés : *punica granatum L*, extrait naturel, polyphénols, activité antioxydant.

Abstract:

In this study we tried to make physicochemical analyzes and evaluate the antioxidant activity of the extract of the bark méthalonique two varieties of pomegranate (*Punica granatum L*) region Mitija and analysis qualitative HPLC.

Indeed the determination of primary metabolites reveals total sugar content (4.27% and 3.46%), 0.55% in protein and fat (0.52%, 0.95%) to extract Kolea sweet and mild Messad respectively.

The quantitative estimation of total polyphenols (by the Folin-Ciocalteu) enregistre values (642.58 and 726.75 mgEAG / g extract), total flavonoids (by the method of aluminum trichloride) (22.67 and 20.04 mg EQ / g extract) and hydrolysable tannins (271.25 and 314.25 mgEAT / g extract) for the variety of Mild Kolea and Messad respectively.

This work aims to evaluate the antioxidant activity through two methods: the method of reducing power and DPPH method shows that the extract of sweet and Kolea Messad are the most active, with IC₅₀ from 12, 83mg / l and 12.96 mg / l respectively, comparing with that of BHT with an IC₅₀ (28.01). The qualitative analysis of the extracts by high performance liquid chromatography revealed the probable presence of quercetin and catechin in both méthaloniques extracts of both varieties.

Keywords: *Punica granatum L*, natural extract, polyphenols, antioxidant activity.

ملخص

المستخلصات النباتية الطبيعية تحتوي على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية لها أنشطة بيولوجية مختلفة في هذه الدراسة قمنا بتحليل فيزيوكيميائية وتقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص ميتانولي لقشور الرمان من منطقتين من متيجة .

التحليل الفيزيوكيميائي أظهر مجموع محتوى السكر (4.27% و 3.46%) و 0.55% من البروتين والدهون (0.52%)، 0.95% لمستخلص القليعة و مسعد على التوالي.

التقدير الكمي لمجموع البوليفينول Folin-Ciocalteu القيم 642,58 -726,75 (ملغ/ EAG غ من المستخلص)

مجموع مركبات الفلافونويد (FeCl₃) (22.67 و 20.04 ملغ / EQ غ من المستخلص) و مركبات Tanins

(271.25 -314.25 ملغ /AT غ من المستخلص) لنوعي القليعة و مسعد على التوالي.

يهدف هذا العمل إلى تقييم نشاط مضادات الأكسدة من خلال طريقتين: طريقة القوة الارجاعية و طريقة الـ DPPH تبين ان مستخلص القليعة و مسعد هم الاكثر نشاط بكمية 12,96 IC50 12,83 ملغ/لتر على التوالي بالمقارنة مع BHTIC50,28,01 ملغ/لتر. التحاليل النوعية للمستخلصين ب HPLC اثبتت وجود quercétine ,cathéchine.

كلمات البحث: مستخلصات طبيعية، البوليفينول، نشاط المضاد للأكسدة. Punica granatum L

Introduction générale

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant, l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Malgré que l'Algérie, soit un pays connu par ses ressources naturelles, et dispose d'une flore singulièrement riche et variée, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier le fruit du grenadier (*Punica granatum*) de la famille des Punicaceae très apprécié ces dernières années par la population algérienne. Ces écorces sont utilisées, de façon empirique, dans les médecines traditionnelles, pour soigner les maladies gastro-intestinales.

On observe actuellement une évolution du statut de cette espèce dans notre pays : bien que longtemps considérée comme simple fruit oublié, de plus en plus de chercheurs lui réattribuent aujourd'hui son vrai statut de plante nutritionnelle et médicinale.

Par ailleurs, nous n'avons relevé aucun travail consacré à l'étude et à la caractérisation des composants de ces variétés algériennes.

Notre travail s'est porté sur l'investigation de deux d'entre elles, faisant partie du genre *Punica* (Punicaceae). Cette famille avec ses différentes espèces a été relativement peu étudiée. Ainsi, un travail considérable persiste, tant sur le plan de la classification botanique, que phytochimique. Nous nous intéressons ici en premier lieu à la caractérisation de la composition physico - chimique de cette plante. En effet, quelle valeur aurait l'identification de métabolites secondaires (polyphénols) d'une plante, si celle-ci n'était pas clairement définie d'un point de vue physico chimique ?

Introduction générale

Cette étude va porter sur ces deux domaines, puisque le genre *Punica* avec ces deux variétés n'a, à l'heure actuelle, jamais été révisé d'un point de vue physicochimique et n'a fait l'objet que de quelques investigations phytochimiques (variété non identifiée).

Dans ce contexte, notre travail vise à démontrer la richesse des pelures de ce fruit en composés phénoliques et de déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela, notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Il porte également sur le diagnostic et la séparation des principaux composés phénoliques par l'utilisation d'une technique chromatographique (HPLC).

Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante des flavonoïdes vis-à-vis du radical libre DPPH.

Pour cela, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Analyse physico chimiques des deux variétés de la grenade ;
- Extraction des composés phénoliques ;
- Analyse quantitative et qualitative du contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins des différents extraits de *Punica granatum L* ;
- Évaluation du pouvoir piègeur des différents extraits vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH), et du pouvoir réducteur.

Ce travail vise la valorisation du fruit de ces deux variétés du nord de l'Algérie. Ses écorces sont utilisées en médecine traditionnelle. Cela permettra de relier les éléments d'informations apportés par les ethnobotanistes aux effets physiologiques observés par les biologistes d'autres pays et les confirmer sur nos variétés.

Comme nous ne disposons d'aucune étude qui différencie l'étude qualitative et quantitative de ces deux variétés, ainsi notre travail sera présenté comme suit :

L'état des connaissances bibliographiques botaniques et phytochimiques sur le genre *Punica* et leur famille Punicaceae ;

Dans un deuxième chapitre, nous aborderons un aperçu général sur les composés phénoliques.

Le troisième chapitre sera consacré à des généralités sur l'oxydation et les antioxydants.

Introduction générale

Dans la partie « matériels et méthodes », les méthodes d'analyses classiques utilisées dans ce travail, la préparation des échantillons, et l'instrumentation utilisés sont décrites.

La dernière partie sera consacrée à la présentation des résultats et à leurs discussions.

Enfin, une conclusion générale portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives.

Première partie

Synthèses bibliographiques

Chapitre I

**Monographie de *Punica*
*granatum L***

Le grenadier grenade *punica granatum L*, est une espèce de climat tempéré, principalement cultivé dans la région méditerranéenne, l'Asie méridionale, et dans plusieurs pays de l'Amérique du Nord et l'Amérique du Sud (**Strover et Mercure, 2007**).

La popularité de la grenade a augmenté énormément surtout dans la dernière décennie en raison des effets : antimicrobiennes, antioxydant puissant, antiviral, anticancéreux et anti-mutagénique, du fruit (**Negi, Jayapraksha et Jena, 2003**).

1.1.Étymologie :

Le mot *Punica* vient du mot latin *puniceus*, qui signifie rouge écarlate : couleur des fleurs (**Bonnier, 1990**) et *granatum* « *granatus* » qui signifie "abondant en grains. La grenade a été désigné par **Pline** l'encyclopédiste romain du 1er siècle, par *malum granatum*, il employait aussi le terme de *malum Punicum* « pomme de Carthage » ou *punica arbor* « arbre punique » c'est-à-dire de Carthage. En 1753, **Carl Von LINNE** reprit ces expressions de lieu pour dénommer le nom de genre *Punica* « de Carthage ». Dernièrement elle sera alors renommée *Punica granatum*. *Punica* en souvenir des guerres puniques ou peut-être pour *puniques* qui signifie rouge écarlate en latin, et *granatum* pour la multiplicité des graines contenues dans le fruit, (**Mars et al., 1994**). Ce mot grenade vient du latin *grana* : « grain », (**Margot et Sphon., 2007**).

1.2. Origine et historique :

Le grenadier est cultivé depuis la plus haute Antiquité pour ses fruits comestibles (les grenades) et pour les qualités ornementales de ses grandes fleurs (**Jurenka JS, 2008**).

C'est dans l'ancienne Perse que fut connue pour la première fois la culture du grenadier environ 2000ans avant l'ère chrétienne. C'est de la Perse que le Grenadier fut importé en occident dans la région méditerranéenne de l'Europe et de l'Afrique du Nord, et en Orient dans le Turkestan, l'Afghanistan, les Indes et la Chine.

Historiquement, la grenade était connue et appréciée de tous les peuples antiques, par les juifs, par les égyptiens, par les phéniciens et par les grecs et les romains pour ses qualités médicinales et gastronomiques.

D'après **NIKOLAI VAVILOV**, le grenadier appartient au Centre IV : Centre du Proche Orient (Asie Mineure). Actuellement, il est cultivé dans de nombreux pays, notamment l'Espagne, les États-Unis, l'Iran, la Turquie, l'Inde, Israël, la Chine et les pays de la côte nord de l'Afrique, entre autres. L'Espagne est le premier producteur d'Europe, et la production y est concentrée dans la Communauté Valencienne, en Andalousie et dans la région de Murcie Transcaucasie, Iran et régions hautes du Turkménistan.

1.3. Description botanique :

C'est un arbre fruitier appartenant à la famille des Punicacés qui comprend trois espèces différentes : *Punica protopunica*, *Punica nana* et *Punica granatum*, espèce la plus commune.

L'espèce *Punica granatum*, sur le plan botanique partage son nom de famille avec son ancêtre génétique *Punica Protopunica*, dont l'habitat se limite à l'île de Socotra à la rencontre de mer et de l'Océan indien, dépendance du Yémen (**Storey, 2007; Joannet, 2009**).

Cependant, dans la culture française, cet arbre s'est vu attribuer d'autres noms vernaculaires, moins courants. Ainsi, grenadier est synonyme de : Granatier, Migranier et de Miougranié (**Planshon G et al., 1875**).

Le grenadier peut exister sous forme d'arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon subspontanée ou cultivée (**Garnier G, 1961**)

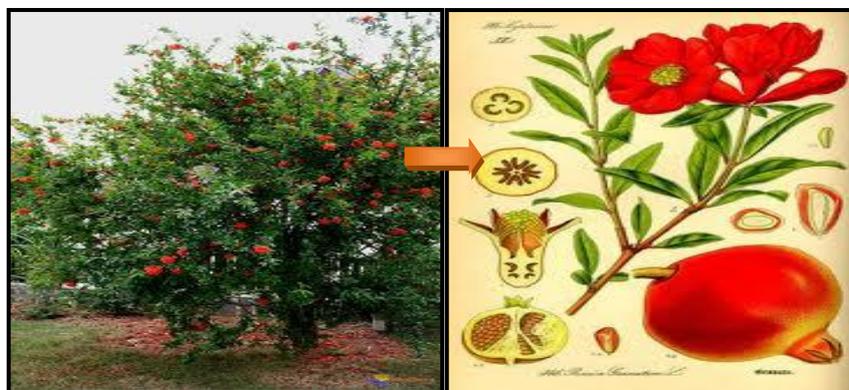


Figure n°1 : Arbre et planche illustrée taxonomique de *Punica granatum L* (**Ashton R et al., 2006**)

Il est reconnu par ses feuilles qui sont opposées et caduques, vertes et brillantes, ovales ou lancéolées, 2 - 8 cm de long, bord entier (**Schonfelder et Ingrid, 1988**). Les feuilles du grenadier tombent les rejets ou être en touffes sur les pousses courte.



Figure n°2 : Feuilles de *Punica granatum L* (www.plant-identification.co.uk).

Pour la fleur, elle est de couleur rouge orangé éclatant de 3 cm de diamètres environ, isolées ou groupées par 2 à 4 à l'extrémité de tiges . Le calice jaune rougeâtre épais adhère au fruit qui persiste à son sommet.

A l'intérieure ; 5 -7 pétales chiffonnés alternent avec les sépales, nombreuses étamines minces et jaunes (**Bossard et Cuistance., 1986**). Les fleurs s'épanouissent en juin – juillet (**Bonnier, 1990**).



Figure n°3 : Fleurs aux sépales charnus et rouges et aux pétales froissés
(www.plant-identification.co.uk).

Le fruit qui arrive à maturité en Septembre (dans l'hémisphère nord) est une baie sphérique ou globuleuse, à peau épaisse lisse, couronnée au sommet par le

restes durcis du calice, de 7-12 cm de diamètre, jaunâtre à brun _ rouge à maturité et souvent marbrée de taches aux couleurs plus vives.

Elle est divisée par de nombreuses parois. Ainsi se forment des loges dans lesquelles se trouvent de nombreuses graines triangulaires mesurant jusqu'à 15 millimètres qui sont entourées d'une enveloppe (arille) translucide très juteuse de couleur rouge foncé à rose clair qui éclate à la moindre pression.



Figure n°4 : Grenades et leur calice denté (www.plant-identification.co.uk).

Cette baie renferme de nombreuses graines contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et membraneuses. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit. **(Batles A., 1998).**



Figure n°5 : Grenade et ses nombreuses graines **(Batles A., 1998).**

Les fruits ne continuent pas à mûrir après la cueillette, ils font partie des fruits non-climactériques.

Ce fruit ou grenade est formée de trois parties principales, ayant chacune leur propre caractère métaphysique, botanique et chimique. Ces parties sont les pépins ou « arilles », le jus et la peau (**Storey, 2007**).

1.4. Place du grenadier dans la systématique :

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Telle est cette classification :

Règne : végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum*

En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c'est à dire des plantes à graines, est créée par un groupe de botanistes, l'*Angiosperm Phylogeny Group* ou APG. Cette classification phylogénétique réorganise le règne végétal en fonction de critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et d'un nucléaire de ribosome. Ainsi pour certaines espèces végétales, les résultats moléculaires sont en accord avec les anciennes classifications alors que pour d'autres espèces végétales, il est nécessaire de modifier leur position dans la systématique. Ces résultats reconsidèrent la phylogénie des plantes. Cette nouvelle organisation se compose alors de 462 familles réparties dans 40 ordres (**Spichiger, Savolainen et al., 2004**).

Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APG2, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est :

Classe : Angiospermes
Sous classe : Dicotylédones vraies
Clade : Rosidées
Ordre : Myrales
Famille : Lythraceae
Genre : Punica
Espèce : Punicagranatum

Il convient donc de retenir que dans cette nouvelle classification, la famille des Punicacées n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des lythracées, famille comportant 30 genre et 600 espèces (**Spichiger, Savolainen et al., 2004**).

1.5. Répartition géographique et production :

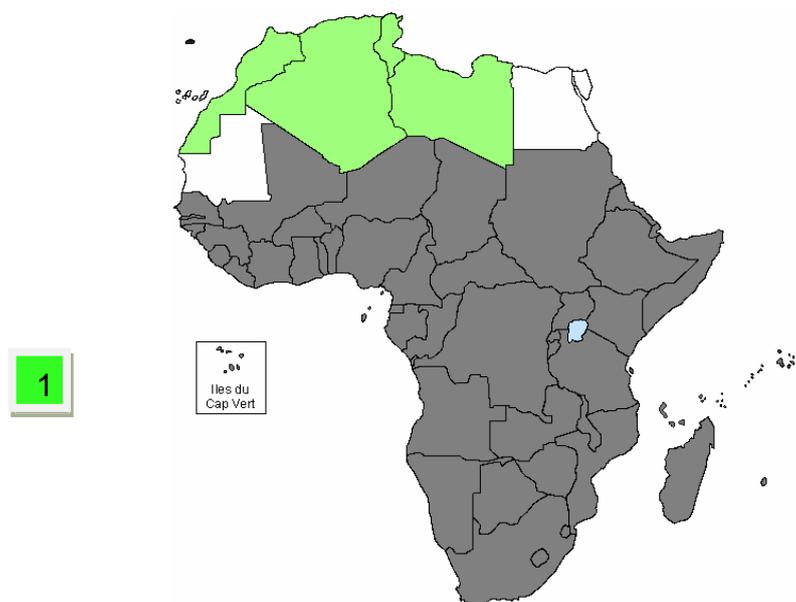
1.5.1 Dans le monde :

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde. Son espace d'origine semble de situer sur le haut plateau irano afghan dont il apprécie les sols rocaillieux et le climat subdésertique. Il s'est développé au Pakistan, au Cachemire et sur le bassin méditerranéen depuis les temps les plus anciens.

Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc.

On le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée.

De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique. Il est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride. (**Wald E., 1982**)



(1) Afrique

Figure n°6 : Répartition géographique de la grenade (**Wald E., 1982**).

Le grenadier est, avec la vigne et le figuier, l'un des premiers arbres à cultiver par l'homme. (**Henri J, 2009**).

En ce qui concerne la production, les pays les plus producteurs de grenades sont l'Iran, la Turquie, la Transcaucasie et l'Inde mais aussi dans la zone méditerranéenne la Tunisie, le Maroc, l'Espagne, l'Italie et la Grèce.

Aux Etats-Unis et plus particulièrement en Californie, la culture de la grenade est très développée.

La production de grenade est en nette augmentation ces dernières années, montrant un regain d'intérêt pour ce fruit oublié depuis plusieurs décennies.

1.5.2. En Algérie :

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans les petits jardins en Kabylie. On ne connaît que leur appellation locale (Lahlou, Elmouse,...). Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'état (**tableau n °1**), (**INRAA, 2006**).

Espagne	Gajin	Selection station
Corde travita	Sefri	Chelfi
Mollerhuesso	Zemdautomne	Doux de Kolea
Mellisse	Sulfani	Messaad
Papers shell	Spanichduoy	

Tableau n°1 : variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie (INRAA, 2006).

En Algérie, la superficie de la culture du grenadier en Algérie est estimée à 9161ha en 2012, avec une baisse rapport à la campagne précédente (9566 ha). A signaler que plus 60% est concentré au niveau du sahara (Biskra et Djelfa) et la wilaya de Mostaganem.

Le profil variétal est composé de deux groupes :

- Les grenades de couleur rouges et jaunes : Sefri, Doux de Koléa, Messaad ...
- Les grenades acides à pépins durs qui sont destinées à la transformation.

La période de la production se situe entre les mois d'octobre et de novembre.

La qualité des fruits est tributaire des variétés et des conditions du milieu notamment au niveau des zones à forte humidité où il y a risque de maladie causant la pourriture du fruit.

La production en grenades de la campagne 2011-2012 est estimée à 717063Qx. Elle a marqué un accroissement de 10% par rapport à la campagne précédente (674 660Qx).

Le rendement moyen a excédé les 78,3Qx/ha en 2012, sachant que les rendements sont variables d'une wilaya à l'autre et dépendent des ressources hydriques mobilisées au profit de cette culture, (**Madr, 2013**).

1.6. Composition biochimique du fruit :

Le grenadier suscite un intérêt chez les anciens chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre, tel que la pelletiérine. 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.

Le fruit de grenade se compose de trois parties : l'écorce (peau de la grenade), les graines, et le jus (**Lansky et newman, 2007**).

Partie comestible 50%	80% arilles (jus) 20% pépins	eau (85 %); sucres (10 %), principalement fructose et glucose; acides organiques (1,5 %), essentiellement acide ascorbique, citrique et malique; composés bioactifs tels que polyphénols et flavonoïdes (essentiellement anthocyanines). les graines de grenade sont une source importante de lipides, car les pépins ont une teneur en acides gras qui oscille entre 12 et 20 % de leur poids total (poids sec).les protéines, protides (1,5%)
Écorce ou péricarpe 50%	Environ 50 % du poids total de la grenade correspond à l'écorce et aux membranes blanches, qui sont une source très importante de composés bioactifs, tels les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitanins, les proantocianidines et les minéraux, essentiellement du potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium.	

Tableau n° 2 : composition biochimique de la grenade (**Angel A et al., 2010**)

1.7. Composition phénolique de la grenade :

1.7.1. Composés phénoliques à faible poids moléculaire :

Les composés phénoliques peuvent être divisés en molécules simples, et en polymères de celles-ci ayant un poids moléculaire plus élevé. Parmi les premières il convient de citer les flavonoïdes, qui sont les composés les plus importants de ce sous-groupe ; tandis que les anthocyanosides sont les composés les plus représentatifs, responsables de la couleur caractéristique de la grenade. Parmi les composés phénoliques à faible poids moléculaire il faut mettre l'accent sur les acides phénoliques, et parmi ces derniers sur l'acide gallique et l'acide ellagique (**Angel A et al., 2010**).

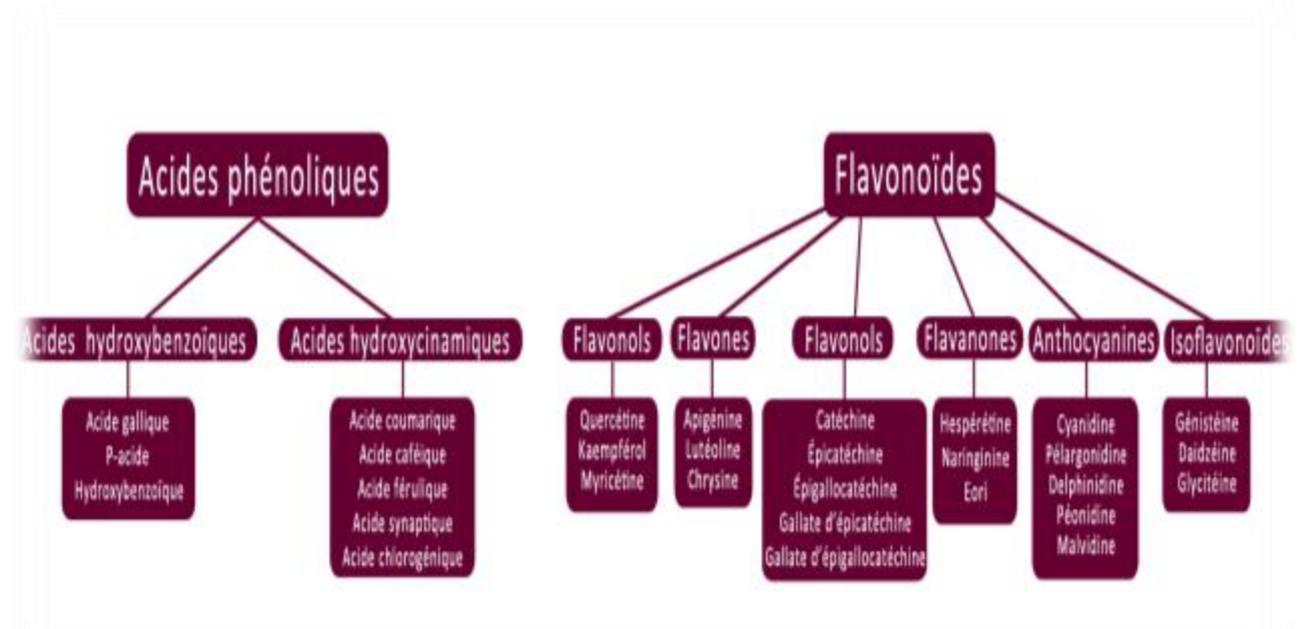


Figure 7 : Composés phénoliques à faible poids moléculaire

1.7.2. Composés phénoliques à poids moléculaire élevé :

Les tanins sont les polyphénols à poids moléculaire élevé les plus caractéristiques. L'écorce de la grenade est riche en tanins hydrolysables, principalement en punicaline, pédunculagine et punicalagine (**Angel A et al., 2010**).

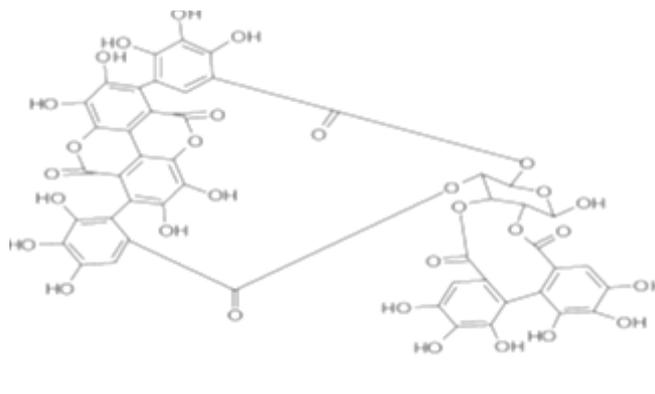


Figure n° 8 : Structure moléculaire de la punicalagine.

1.8. Propriétés thérapeutiques de la grenade :

La grenade a été utilisée depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques. En médecine Ayurvédique, la grenade est considéré comme « une pharmacie en soi » et elle a été utilisé comme agent antiparasitaire, un « tonique sanguin » et pour traiter les aphtes, les diarrhées et les ulcères. La grenade a servi aussi de remède pour le diabète dans le système Unani de la médecine pratiquée au Moyent Orient et en Inde (**Jurenka JS, 2008**). Les propriétés thérapeutiques potentielles de la grenade sont très variées et incluent traitement et prévention du cancer, les maladies cardiovasculaires, diabète, dysfonctionnement érectile et protection contre les radiations ultraviolettes. Ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydant, anticarcinogénique, anti-inflammatoire et antidiabétique de grenade.

1.9. Utilisations de la grenade :

1.9.1. Utilisation culinaires :

Tout d'abord, la grenade peut être utilisée en fruit de table. Dans ce cas, le fruit se mange nature ou accompagné de sucre, à décortiquer grain par grain. Pour déguster commodément la grenade, il est préférable de prélever à la cuillère les petits grains pulpeux.

Ces grains peuvent également servir à garnir une salade de fruits, lui apportant une saveur sucrée acidulée.

1.9.2. Utilisation en industrie agroalimentaire :

L'industrie agro-alimentaire et en particulier l'industrie des boissons s'intéresse de près à la grenade, avant tout pour son côté exotique et son goût nouveau. Le jus Pomegreat commercialisé depuis quelques années en Grande-Bretagne (mélange de grenade, aronie et autres fruits rouges) s'est ainsi imposé avant grâce à son goût agréable.

1.9.2. Utilisation en industrie cosmétique :

Les puissantes propriétés antioxydantes de la grenade en font un ingrédient de choix pour la cosmétique, en particulier dans les produits dermatologiques visant à protéger la peau du cancer. Afaq et al. ont en effet montré une action inhibitrice de l'extrait de grenade sur le cancer de la peau chez la souris (**Afaq F et al., 2005**).

Par ailleurs, l'extrait de grenade est déjà incorporé dans plusieurs lignes de produits cosmétiques qui exploitent son parfum, ses propriétés hydratantes et, adoucissantes ainsi que ses effets raffermissant (crèmes anti-cellulite).

1.9.3. Autres utilisations :

L'écorce de la grenade fut quelquefois utilisée, pour remplacer la noix de galle, dans la préparation de l'encre.

Le grenadier fournit de nombreux principes tinctoriaux, aux couleurs très variées, tels que le vert, une large palette de jaunes, des gris, bruns et noirs. Les parties utilisées de cet arbre sont essentiellement l'écorce des grenades.

Les teinturiers de cuir de Fez et Marrakech employaient les écorces de fruits verts pour réaliser des jaunes pâles et les écorces de fruits bien mûrs pour les tons dorés (**Cardon D, 2003**).

Chapitre II

***Structures et caractérisation
des composés phénoliques***

Les plantes produisent une grande diversité de métabolites secondaires pour la défense et le suivie dans l'écosystème. Ils dépassent actuellement 100 000 substances identifiées, et appartiennent à trois principales classes chimiques : les terpènes (un groupe de lipides), les alcaloïdes (dérivés d'acides aminés) et les polyphénols (dérivés de glucides) **(Benamor B, 2008)**.

Les polyphénols représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différentes que la pharmacologie et l'agroalimentaire **(Macheix J et al., 2006)**.

2.1. Définition :

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures différentes connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale.

Les polyphénols sont des constituants communs des plantes, ils se retrouvent sous forme conjuguées et/ou glycosylées. Ils sont caractérisés comme indique leur nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaires. Ils sont probablement produits comme des métabolites secondaires responsables de plusieurs propriétés organoleptiques des végétaux, particulièrement, de couleur et d'astringence et agir comme des détergents normaux au pâturage des animaux et en tant qu'agent antimicrobiens **(Laurent C et Oestveldt K, 2008)**.

Ils sont caractérisés par la présence d'un au moins un motif phénolique (cycle aromatique sur lequel viennent se greffer un ou plusieurs groupement (OH)).



Figure n°9 : Structure du phénol (noyau aromatique).

2.2. Composés phénoliques dans la plante :

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits végétaux car ils sont présents dans la plupart des organes et tissus utilisés ou consommés par l'homme, cependant comme pour la plupart des métabolites dits secondaires, il existe en réalité une extrême diversité de répartition de ces composés selon les espèces et en fonction des différents organes et tissus d'une plante. **(Sarni manchado et Cheyneir, 2006)**.

2.2.1. Répartition cellulaire, tissulaire et dans les différents organes de la plante :

Le niveau d'accumulation des composés phénoliques dans les différents tissus et organes de la plante apparait toujours comme la résultante entre leur biosynthèse, dont les grandes lignes viennent d'être rappelées, et leur utilisation et/ou leur dégradation.

A l'échelle cellulaire, la répartition des composés phénoliques est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement dans deux sites : d'une part, la paroi cellulaire où sont présentes les lignines (et quelquefois certains flavonoïdes et des molécules associées aux lignines comme l'acide férutique) et la vacuole où sont stockés les phénols solubles (acide chlorogénique, anthocyane, flavonols, tanins,...). Certains flavonoïdes (quercétine, kaempférol) pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique **(Sarni-Manchado et al., 2006)** mais toujours à être faible que lorsque des perturbations membranaires interviennent, soit au cours de certaines évolutions physiologiques soit à la suite de divers traitements. L'apparition de brunissement en est généralement la conséquence.

A l'échelle tissulaire, on observe également des répartitions très inégales des différents composés phénoliques **(Sarni-Manchado et al., 2006)**. Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux, en particulier les épidermes des fruits et des feuilles.

Des différences très marquées existent également entre les différents organes d'une plante donnée, chacun d'entre eux (feuille, fruit, graine, racine...) pouvant souvent être caractérisé par son profil polyphénolique **(Sarni-Manchado et Cheyneir, 2006)**.

Les légumes contiennent aussi des quantités importantes de Polyphénols. Le champion toute catégories est l'artichaut avec une concentration de 321.3 mg GAE / 100 g.

Parmi les 20 premiers fruits et légumes les plus riches en polyphénols. 60 % représentent les fruits et le reste des 40 % est représenté par les légumes.

2.3. Facteurs influençant la teneur des plantes en composés phénoliques :

La teneur des végétaux en composés phénoliques est très variable en fonction de nombreux paramètres génétiques, physiologiques, ou environnementaux.

2.3.1. Facteurs physiologiques :

En fonction du stade physiologique on remarque des variations qualitatives et quantitatives très particulière de la teneur en polyphénols des plantes. Les organes jeunes sont quelquefois plus riches en composés phénoliques que les organes âgés dont la teneur en ces composés tend à diminuer au cours de la croissance (**Macheix et al., 2005**).

2.3.2. Facteurs génétiques :

Les variations des teneurs en composés phénoliques sont souvent considérables d'une espèce à une autre et, à l'intérieur d'une espèce, selon les variétés ou les cultivars considérés.

2.3.3. Facteurs externes :

Certains facteurs externes comme la lumière et la température peuvent influencer nettement sur la teneur des plantes en polyphénols, en agissant sur leur métabolisme phénolique. En effet pour la lumière deux paramètres interviennent : d'une part, l'intensité du flux lumineux et d'autre part, la nature des radiations constitutives (**Sarni-Manchado et Cheyneir, 2006**).

La température est également un facteur de régulation de l'expression du métabolisme phénolique, souvent en interaction avec la lumière (**Rhodes et al., 1981**).

Toutefois, la contamination du végétal par des micro-organismes pathogènes entraîne également une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, correspondant à la mise en place du mécanisme de défense de la plante (**Dixon et Paiva, 1995**).

2.4. Principales formes et classes des composés phénoliques :

2.4.1. Les formes simples :

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C₆ (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C₁₅ et à des molécules proches (**Macheix et al., 2005**)

2.4.1.1. Phénols simples :

Selon **Bruneton (1993)**, les phénols simples (catéchol, guaiacol, phloroglucinol,...) sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...).

2.4.1.2. Les acides phénoliques simples :

2.4.1.2.1. Acides hydroxybenzoïques :

- Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque ;
- Ils ont une structure générale de base de type (C₆-C₁) ;
- Ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides.

Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le **tableau n°3**

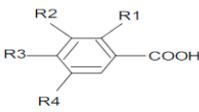
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Tableau n°3 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

2.4.1.2.2. Acides hydroxycinnamiques :

- Ils dérivent de l'acide cinnamique ;
- Ils ont une structure générale de base de type (C6-C3) ;
- Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques ;
- Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau II représente les principaux acides hydroxycinnamiques (tableau n°4).

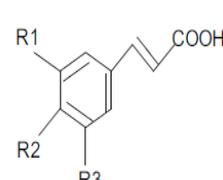
Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Tableau n°4 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

2.4.1.2.3. Coumarines :

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale.

Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (Tableau n°5).

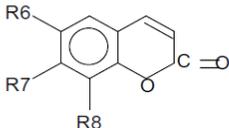
Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aesculol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

Tableau n°5 : Principaux types de coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

2.4.1.3. Les flavonoïdes :

2.4.1.3.1. Généralités :

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavido*, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008). Cependant, d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus*=jaune) (Karaali *et al.*, 2004 ; Malesev et Kuntic, 2007).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.CHERVREUL en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt *et al.*, 2001).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "**french paradox**" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Ghedira, 2005; Malsev et Kuntic, 2007). Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Medic_saric *et al.*, 2004).

2.4.1.3.2. Classification :

Les principales classes des flavonoïdes sont données dans le **tableau n°6**.

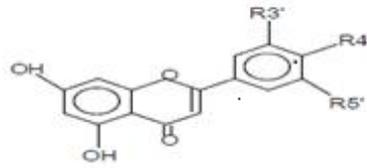
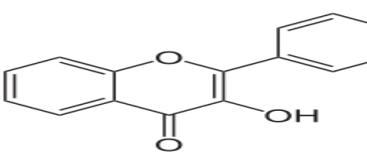
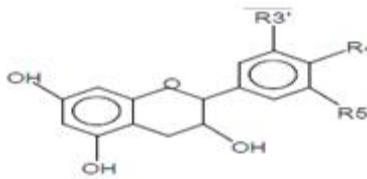
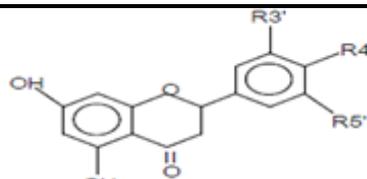
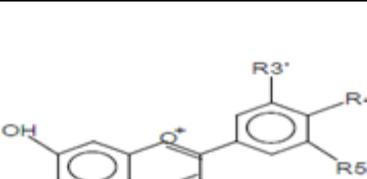
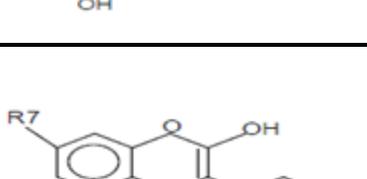
Classes	Structure chimique	R3'	R4'	R5'	exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavanols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelarganidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

Tableau n°6 : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001; W-Erdman *et al.*, 2007).

2.4.1.3.3. Structure :

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants dans nos régimes, les plus nombreux (plus de 5000 molécules isolées) et les plus connus. Ils ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**Erdman et al., 2007**).

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C₆-C₃-C₆ (**Emereciano et al., 2007**) en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (**Narayana , 2001; Malsev et Kunitik, 2007**).

La structure de base ainsi qu'un schéma simplifié des flavonoïdes sont représentés par la structure dans les **figures n°10 et 11 (Dacosta, 2003)**.

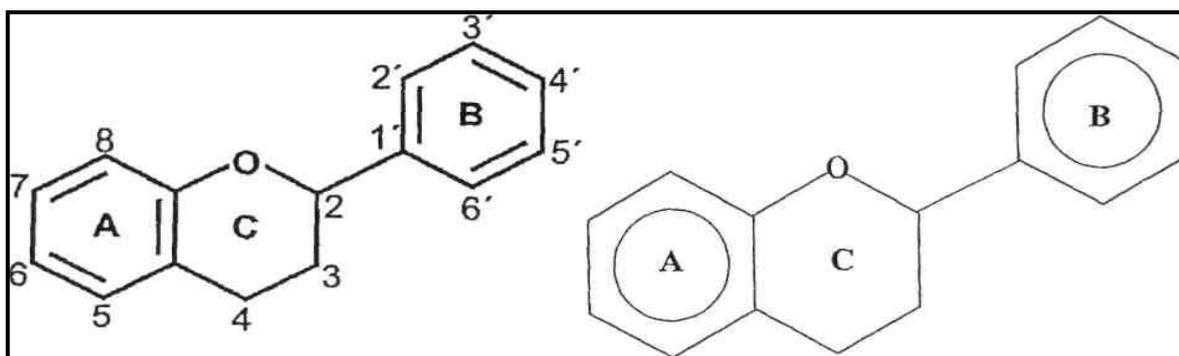


Figure n° 10 : Structure de base des

Figure n°11 : Schéma simplifié des flavonoïdes

2.4.1.3.4. Localisation :

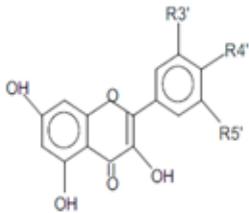
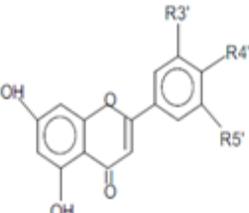
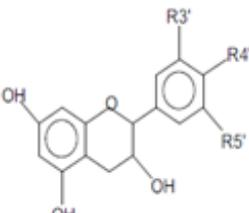
Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (**Hutzler et al., 1998**).

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (**Piquemal, 2008**).

La répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (Boudet, 2000).

2.4.1.3.5. Distribution :

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (Verhoeven *et al.*, 2002), ils peuvent aussi être rencontrés dans certaines boissons et chez certains fourrages (exemple: trèfle) (Urquiaga et Leighton, 2000). (Voir tableau n°7).

Flavonoïdes	Exemples	Aliments	Caractéristiques
Flavonols 	Quercétine Kaempférol	Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou fris', vin rouge, thé.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques
Flavones 	Lutéoline Apigénine	Persil Céleri	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C ₃ , ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV. Mobilité chromatographique et les réactions de coloration.
Flavanols 	Catéchine Epicatéchine Epigallocatechine	Vin rouge, thé, noire, thé vert, cacao, chocolat	Flavanols 3 ainsi que flavan 3, 4 diols son tout les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques.

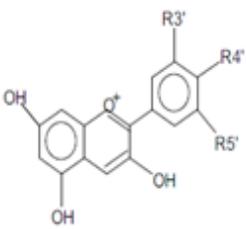
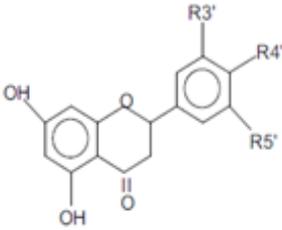
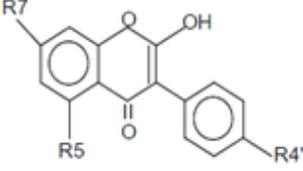
<p>Anthocyanidines</p> 	<p>Cyanidine Delphéridine</p>	<p>Raisin, vin rouge, certaines variétés de céréales.</p>	<p>Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.</p>
<p>Flavanones</p> 	<p>Naringénine Eriodictyol</p>	<p>Fruits du genre Citrus.</p>	<p>Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C₂, C₃ le flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de citrus.</p>
<p>Isoflavones</p> 	<p>Genisteine Daidzeine</p>	<p>Graines de soja et produits qui en dérivent.</p>	<p>Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C₃ ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylées.</p>

Tableau n°7 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes
(Erdman *et al.*, 2007).

2.4.2. Formes condensées :

Ces formes résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées. Selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, on obtient des composés plus ou moins complexes pouvant encore présenter une hydrosolubilité suffisante pour être présents dans la vacuole (tannins, certains produits de brunissement) ou au contraire acquérir un caractère lipophile marqué et s'accumuler alors dans les structures pariétales (lignine, formes présentes dans la cutine et la subérine ...) (Macheix *et al.*, 2005).

2.4.2.1. Les tannins :

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...).

Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**).

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (**Cavin, 1999**).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères) ;
- Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

2.4.2.2. Les lignines :

Ce sont des composés de haut poids moléculaire qui s'accumulent au niveau des parois cellulaires et des vaisseaux de sève où elles sont responsables de leur rigidité. (**Macheix *et al.*, 2005**).

2.5. Rôles et Propriétés antioxydantes des polyphénols :

2.5.1. Propriétés antiradicalaires :

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres découlant aussi bien des réactions d'oxydations de différents nutriments que celle de l'organisme. Le mécanisme global de cette réaction est schématisé dans la figure suivante :

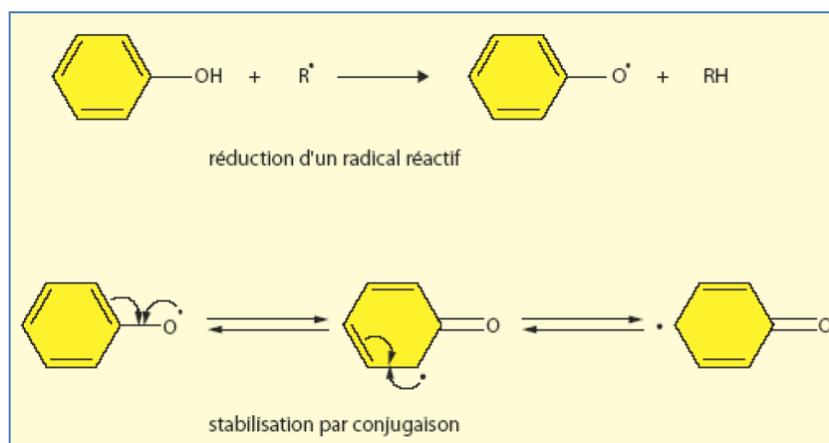


Figure n° 12 : pouvoir antioxydant des polyphénols (**Rolland, 2004**).

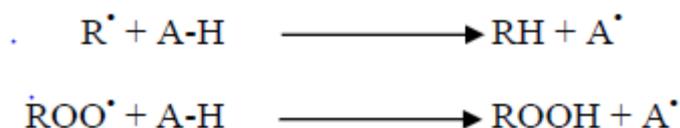
L'oxydation est un phénomène irréversible qui peut et qui doit être ralenti. Parmi les solutions, les meilleurs sont sûrement issue de la nature comme les désormais célèbres tocophérols et polyphénols. Ces derniers doivent leurs activités

(comme leur nom indique), à un très grand nombre de résidus hydroxyles qui sont autant de munitions pour lutter contre les radicaux libres et stopper la réaction de chaîne comme le montre la **figure n°12 (Rolland, 2004)**.

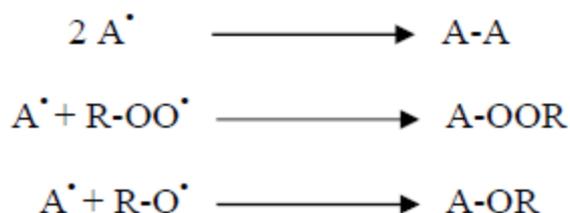
Les polyphénols étant des antioxydants primaires et radicalaires, peuvent ralentir la formation de radicaux libres et interrompre la chaîne autocatalytique.

Dans le cas particulier des lipides, les polyphénols (A-H) réagissent avec un radical libre lipidique pour le convertir soit en acide gras de départ R-H soit en hydroperoxyde.

R-OOH ou en dérivé hydroxylipidiques de type R-OH. Simultanément, un radical A \cdot issu de l'antioxydant est formé. Celui-ci est plus stable que le radical lipidique.



En règle générale, les formes radicalaires de l'antioxydant peuvent soit subir des réactions de réarrangement interne soit réagir entre elles pour donner des dimères ou encore réagir avec second radical lipidique pour stopper la chaîne radicalaires.



2.5.2. Propriétés chélatrices des ions métalliques :

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine

d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus. A titre d'exemple, Cu^{+2} est un stimulateur de la peroxydation des LDL (Tiqwari, 2001).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les polyphénols notamment les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (Malesev et kintic, 2007).

La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux (voir figure n°13):

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B ;
- Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C ;
- Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C.

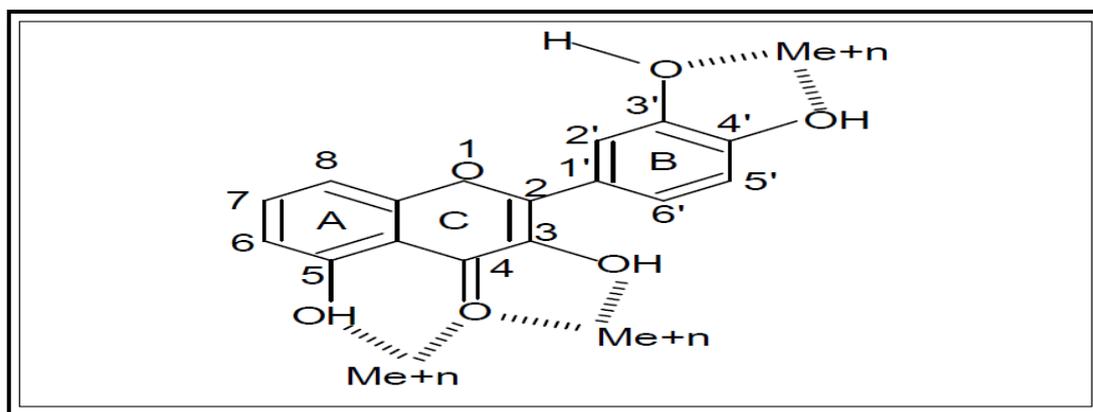


Figure n° 13 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{+n}) (Tiqwari, 2001).

2.5.3. Propriétés antibactériennes :

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les andésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

2.5.4. Propriétés anticancéreuses :

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (**Pincemail et al., 1999**).

Les travaux réalisés par **Mahmoud et al., 2000** in **Depeint et al., 2002** , montrent que les polyphénols permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement, ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induite chimiquement. La quercétine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal tandis que l'apigénine avec la quercétine ont la capacité d'inhiber la phase de métastase. Toutefois, **Caltagirone et al., 2000** in **Depeint et al., 2002** signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

L'activité anticancéreuse des polyphénols est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes :

- Piégeage des radicaux libres ;
- Inhibition du métabolisme d'acide arachidonique ;
- Formation d'un complexe inactif avec le carcinogène (**Hertog, 1996**) ;
- Prévention de l'activation des métabolites carcinogènes ;
- Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ;
- Arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses ;
- Induction de l'apoptose ;
- Inhibition des processus d'angiogénèse (**Ren et al., 2003**).

2.5.5. Propriétés antivirales :

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale des cellules en culture, une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- Au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte ;
- Au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte ;

- Au niveau de la réplication du virus et la synthèse des protéines virales ;
- Au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

L'activité antivirale des polyphénols contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase). Par ailleurs, d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 (Bylka *et al.*, 2004).

2.6. Autres activités biologiques des composés phénoliques :

Les composées phénoliques sont douées d'activités diverses, probablement du à leurs diversités structurales, le tableau suivant englobe les activités biologiques des polyphénols les plus importantes.

Classes de polyphénols	Activités
Acide phénoliques	Anti carcinogènes Anti mutagènes Anti oxydants
Stilbénes	Inhibent l'oxydation des LDL et l'agrégation des plaquettes Anti carcinogènes Anti mutagènes
Coumarines	Anti carcinogènes Anti mutagènes Digestibilité des protéines
Flavonoïdes	Anti carcinogènes Anti mutagènes Anti oxydants
Anthocyanes	Anti oxydants Colorants
Lignines	Anti carcinogènes Anti mutagènes
Tanins	Anti oxydants Anti tumoral Digestibilités des protéines
Proanthocyanidines	Anti inflammatoires Anti bactériens Anti fongiques

Tableau n°8 : Principales activités biologiques des composées phénoliques
(Ferhat M, 2009).

2.7. Intérêts dans l'industrie agroalimentaire :

Les composés phénoliques sont à l'origine du caractère amer de certains produits d'origine végétale, tels que les agrumes et leurs produits dérivés (naringine) et les olives (oléuropéine). Ils sont aussi responsables de l'astringence des fruits des boissons. La maîtrise de ces caractères conditionne l'acceptabilité des produits par le consommateur et présente un enjeu économique majeur pour certaines industries de transformation des végétaux **(Sarni-Manchado P, Cheynier V, 2006)**.

Bien que non connus officiellement comme des additifs puisque ils sont étiquetés comme « épices », les fabricants proposent des condiments en poudre , sous forme d'oléorésine ou d'émulsion à partir des extraits de romarin pour stabiliser les huiles et les graisses, protéger les pigments de caroténoïdes, inhiber le brunissement et stabiliser la saveur .Ces extraits sont utilisés en pâtisserie, produits d'extrusion, huile de soja, saucisson fraîche ...ils sont autorisés seulement dans les États –Unis **(Moll M, Moll N, 1998)**.

Les principaux polyphénols d'intérêts technologique dans la pomme, le raisin, l'orge ou le thé sont les flavonols ou tanins condensés et lorsqu'une couleur rouge est recherchée, les pigments anthocyaniques **(Sarni-Manchado P, Cheynier V, 2006)**.

Les polyphénols peuvent être considérés comme ingrédient fonctionnel .les extraits riches en polyphénols comme thé sont actuellement incorporés aux biscuits, lait, boissons pour des raisons alimentaires dues à leurs effets bénéfiques sur la santé. L'addition des composés phénoliques aux produits à bases de viandes comme antioxydants, à la B-lactoglobuline écume comme stabilisateurs, au lait en tant qu'agent antifongiques et aux nourritures comme inhibiteurs des réactions de brunissement.

Chapitre III

L'oxydation et les antioxydants

Ces dernières années ont été très importantes pour la recherche d'antioxydants. Les épidémiologistes ont attiré notre attention sur le rôle des antioxydants naturels dans les aliments et leurs avantages potentiels pour la santé humaine en relation avec la prévention et la thérapie du stress oxydatif et des maladies apparentées. Ces antioxydants sont aussi largement utilisés comme *additifs* dans l'industrie alimentaire pour empêcher ou retarder l'altération des aliments (**Halliwel et Gutteidge, 1999**).

3.1. L'oxydation :

L'activité des composés phytochimiques attire notre attention du fait de leur rôle potentiel dans la prévention des maladies humaines. Les composés phénoliques sont considérés comme étant le groupe majeur de métabolites secondaires qui contribue à l'activité antioxydante des plantes.

3.1.1. Définition :

L'oxydation est le phénomène qui fait rouiller les métaux, flétrir les fruits et les légumes et fait rancir les graisses. Cette réaction modifie le goût et la couleur de certains aliments.

Sur le plan chimique, l'oxydation est générée par des radicaux libres ; espèces chimiques neutres ou chargées instables qui ne cherchent qu'à récupérer un électron dans leur environnement pour retrouver un état stable, très rapide et se propage en chute. Ils ciblent tous les corps gras comme les phospholipides des membranes cellulaires mais aussi les protéines. Dans le cas des enzymes, l'oxydation entraîne une modification ou une perte de l'activité biologique de la molécule, ce qui provoque des désorganisations cellulaires parfois irréversibles entraînant la mort cellulaire.

3.1.2. Causes et conditions d'oxydation :

Le déclenchement de l'oxydation des aliments est dû à plusieurs facteurs (Frankel, 2000 ; Hultin, 1994 ; Hseih-Wilson, 1996) ; les facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras des lipides (nombre et position des insaturations), la présence de pro-oxydants (ions métalliques, enzymes), les formes activées de l'oxygène (radicaux libres, espèces oxygénées réactives,...) ou d'antioxydant naturels (tocophérols, caroténoïdes...).

Les facteurs externes tels que la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité de l'eau, les conditions de stockage et de transformation (Hultin, 1994 ; Hseih-Wilson, 1996) sont la cause de l'oxydation des aliments.

3.2. Les antioxydants :

3.2.1. Définition d'un antioxydant :

Une définition large du terme antioxydant donné par Halliwell (1994) est « toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat ».

Les antioxydants sont des composés, naturels ou ajoutés, qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation et apparaissent ainsi comme essentiels pour maintenir la qualité des aliments et les protéger des oxydations (Rice-Evans *et al.*, 1997 in Macheix *et al.*, 2005).

3.2.2. Classification des antioxydants :

3.2.2.1. Antioxydants naturels :

Le groupe le plus important d'antioxydants naturels comprend la vitamine E (tocopherol), les flavonoïdes et autres composés végétaux (Buettner, 1999, Pelli et Lyly, 2002).

➤ **Acide ascorbique :**

L'acide ascorbique ou **vitamine C** est un nutriment essentiel pour l'homme, elle exerce divers activités biologiques, notamment Co-substrat de plusieurs oxygénases et d'oxydases, c'est aussi un important antioxydant hydrosoluble capable d'interagir avec plusieurs dérivés de l'oxygène o_2^- , H_2O_2 , O_2 , NO et OH (Neve, 2002).

➤ **Caroténoïdes :**

Les caroténoïdes sont un groupe dont la structure de base comprend toujours un ensemble de doubles liaisons conjuguées, responsables de la couleur caractéristique (lycopène, xanthophiles, lutéine, zeaxanthine,...). (Corpet, 2002 ; Berset, 2006).

➤ **Vitamine E (α-tocophérol) :**

Selon **BERSET (2006)**, le D-α-tocophérol (vitamine E) possède la plus abondante distribution naturelle et la plus grande activité biologique.

3.2.2.2. Les antioxydants de synthèse :

Le BHT (Butylhydroxytoluène ou E321) est un monophénol de synthèse très utilisé industriellement comme antioxydant. De même le BHA (Butylhydroxyanisole ou E320) fait partie du groupe des monophénols de synthèse, il est obtenu à partir d'un mélange de deux isomères en proportions égales : 3-tertiobutyl-4-hydroxytoluène. La dose autorisée varie de 0,01 à 0,02% du poids de la matière grasse contenant dans l'aliment.

3.2.2.3 Les antioxydants enzymatiques :

➤ **Le superoxyde dismutase et la catalase :**

Les superoxydes dismutases(SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en molécules de peroxyde d'hydrogène (**Théron et Bennefont, 2006**). Selon **Menvielle-Bourg (2005)**, cette enzyme inactive l'ion superoxyde (point de départ de la chaîne de production des radicaux libres) en le transformant en peroxyde d'hydrogène (**H₂O₂**), celui-ci est ensuite rapidement catabolisée par la catalase et les peroxydases en dioxygène (**O₂**) et en molécules d'eau (**H₂O**) (**figure14**).

➤ **Gluthation peroxydase (GPX) :**

La **GPx (figure14)** est une enzyme capable de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (*Glutathion*), (**Théron et Bennefont-Rousselot, 2006**).

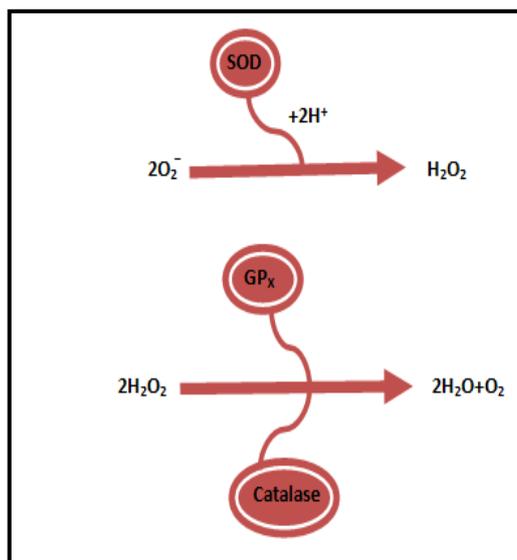


Figure n°14 : Rôle des enzymes antioxydantes dans le processus d'inactivation de l'ion superoxyde (Menvielle-Bourg, 2005).

3.3. Activité antioxydante des polyphénols :

➤ Pouvoir antioxydant :

Les composés phénoliques ont la particularité de posséder plusieurs groupements hydroxyles greffés sur un noyau benzénique qui sont responsables de leur pouvoir antioxydant.

➤ Mécanisme antioxydant :

Grace aux propriétés précédentes, les composés phénoliques peuvent céder un hydrogène aux peroxydes lipidiques **LOO** pour les stabiliser sous forme d'hydroperoxydes **LOOH** et bloquer les réactions de propagation de la chaîne d'oxydation.

La délocalisation de l'électron non apparié sur le cycle aromatique et l'absence de site d'attaque de l'oxygène empêchent la propagation de nouvelles réactions radicalaires.

➤ Flavonoïdes

Comme il était évoqué dans la partie consacrée aux composés phénoliques que beaucoup de flavonoïdes ont une bonne activité antioxydante, due principalement à la configuration catéchol du noyau B (Brese, 2006).

3.4. Le stress oxydatif :

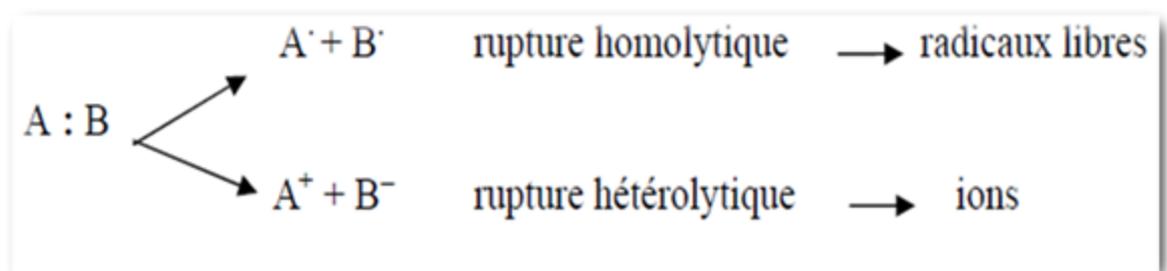
3.4.1. Historique :

Les radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement.

En 1969, les Américains Mc Cord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

3.4.2. Définition d'un radical libre :

La majeure partie de la toxicité de l'oxygène provient de la formation de radicaux libres, c'est-à-dire, selon la définition proposée par Halliwell et Gutteridge, d'espèces capables d'existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires. Ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente selon le schéma suivant : (**Bonnefont-rousselot et al., 2003**).



Après une rupture homolytique, chacun des deux électrons intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant un à une autre molécule: ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano à la milli seconde) **(Koechlin-Ramonatxo, 2006)**.

Bien que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou à un oxydant, il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres **(Diallo, 2005)**.

3.4.3. Rôle des radicaux libres :

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose, ont été découvertes récemment.

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes **(Favier, 2003)**, à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire **(Ardestani et Yazdanparast, 2007)**.

3.4.4. Définition du stress oxydant :

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant **(Favier, 2003)**.

Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie, ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit (**Diallo, 2005**). L'importance des dommages du stress oxydant dépend de la cible moléculaire, de la sévérité de l'effort et du mécanisme par lequel l'effort oxydant est imposé (**Aruoma, 1999**).

3.4.5. Origine du stress oxydant :

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. L'organisme peut avoir à faire face à une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée, qui sera observée dans les intoxications aux métaux lourds, les ischémies/reperfusions suivant des thromboses (**Favier, 2003**), le dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale ; l'activation de systèmes enzymatiques ; la libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules (**Pincemail, 2002**).

Les radicaux libres sont produits pendant l'irradiation, par la lumière UV, par rayons X et par les rayons γ . Ce sont des produits des réactions métal-catalysées présents comme des polluants dans l'atmosphère ; ils sont produits par des neutrophiles et des macrophages pendant l'inflammation et se sont des sous-produits des réactions mitochondrie-catalysées de transport d'électron et d'autres mécanismes (**Valko et al., 2006**).

L'ingestion d'alcool est suivie par la formation de radicaux libres, également des antibiotiques, des anticancéreux. L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme (**Mohammedi, 2006**). Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant. (**Pincemail, 2002**).

Généralement, le stress oxydant sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme (**Favier, 2003**).

3.4.6. Conséquences du stress oxydant :

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (**Kœchlin-Ramonatxo, 2006**).

La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines. Les EOR sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine. Les EOR sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques.

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN, mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques.

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les EOR attaquent les muco- polysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage.

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppressions.

3.4.7 Les maladies liées au stress oxydant :

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux.

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

3.5. Mécanisme d'action des antioxydants :

D'après **Berset (2006)**, les antioxydants s'utilisent pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés et l'effet des antioxydants provient de plusieurs mécanismes :

- ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers ;
- ils abaissent la pression partielle en oxygène et chélatent les métaux de transition ;
- ils désactivent les espèces oxygénées réactives et détruisent les hydroperoxydes en interrompant la liaison O-O ;
- ils inactivent également les enzymes de peroxydation.

En effet, certains antioxydants de type phénoliques réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par **Sherwin** décrit comme suit : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un intermédiaire radical stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (**figure 15**).

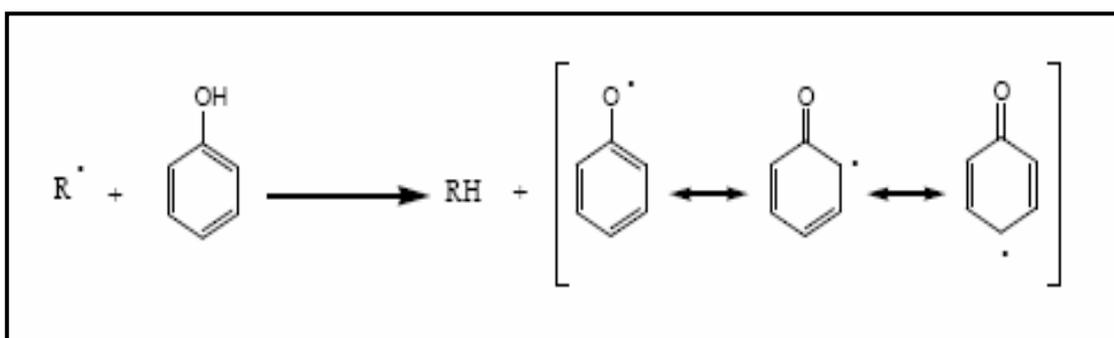


Figure n° 15 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques (**Sherwin, 1976**).

3.6. Méthodes de mesure de l'activité antioxydante :

La mesure du potentiel antioxydant et le suivi des processus d'oxydation sont abordés globalement en déterminant des produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels, plusieurs analyses peuvent être effectuées dont les principales sont cités dans **le tableau n°9**.

Tests	DPPH	ABTS ou TEAC	ORAC
Mécanismes réactionnels	• transfert d'électron majoritaire	• transfert d'électron et de proton	• transfert de proton
Nature des molécules testées	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles	•hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	• CI50 et/ou en mg ou μ mol équivalent Trolox.	• CI50 et/ou en mg ou μ mol équivalent Trolox.	• CI50 et/ou en mg ou μ mol équivalent Trolox.
Avantages	•très facile à mettre en oeuvre • peu couteux	• très facile à mettre en oeuvre • cinétique de réaction très rapide • peu couteux	•facile à mettre en oeuvre •couteux (nécessité d'un fluorimètre) • Utilisation d'un générateur de radicaux (ROO•)
Inconvénients	• encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires •interférences possibles à 515 nm •forte dépendance au pH et au solvant • radical inexistant <i>in vivo</i>	• produits de dégradation antioxydants • radical inexistant <i>in vivo</i>	• mécanismes de génération des ROO• non physiologique • interférences possibles des protéines
Références	[Brand-Williams <i>et al.</i> , 1995; Pinelo <i>et al.</i> , 2004]	[Awika <i>et al.</i> , 2003; Arts <i>et al.</i> , 2004; Osman <i>et al.</i> , 2006]	[Ou <i>et al.</i> , 2001; Lopez <i>et al.</i> , 2003]

Tableau n°9 : description de quelques tests antioxydants in vitro (Pior I *et al.*, 2005) .

Deuxième partie

Étude expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

1.1. Matériel végétal :

Les pelures choisies du matériel végétal ont obéi à des considérations bibliographiques tout à fait pertinentes, qui ont montré une chimio-diversité remarquable de cette espèce à travers des travaux effectués sur des échantillons provenant de l'Iran, de la Turquie, du Maroc et de la Tunisie.

Nous avons voulu, pour notre part, apporter une contribution à cette chimio-diversité par l'étude de la variété Algérienne. Le deuxième critère de choix se rattache aux vertus médicinales de cette plante.

1.1.1. Choix de la variété :

Les écorces (pelures) étudiées proviennent du fruit de deux variétés du grenadier *Doux de Koléa* et *Doux de Messad* récoltés au niveau de la région de Mitidja dans la wilaya de Blida à environ 35 km d'Alger.

La confirmation de l'identification des plantes a été faite au niveau de la Station Expérimentale de Boufarik

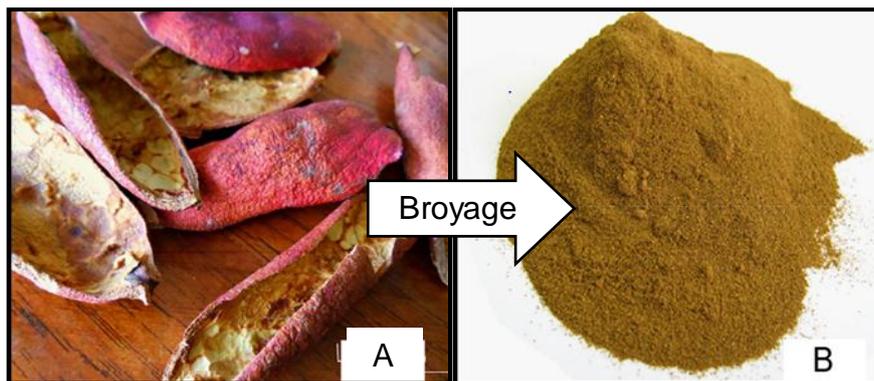
1.1.2. Sites d'échantillonnage :

Les variétés étudiées proviennent de la Station Expérimentale de Boufarik située au nord de la Mitidja et les fruits sont prélevés durant le stade de maturation, complète (mi- Septembre – début Octobre 2012).

1.2. Préparation de l'extrait :

Le matériel végétal est constitué par la partie externe de notre fruit (pelure). Une fois les fruits récoltés, arrivés au laboratoire sont lavés avec de l'eau distillée, séchés avec du papier absorbant avant de séparer la pelure de la pulpe. La pulpe est conservée au 20°C pour utilisation ultérieure.

Après avoir déterminé la teneur en eau, les pelures sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière et à température ambiante. Une fois séchées, les pelures ont été coupées en petits morceaux, pilées au mortier traditionnel pour obtenir une poudre grossière, puis réduite en poudre fine à l'aide d'un moulin à café. Nous avons obtenu une poudre fine de couleur jaune, conservées dans les flacons en verre fumé dans un endroit sec. C'est cette poudre que nous avons utilisée pour la préparation de nos extraits.



Photos A : Pelures du fruit du grenadier **Photos B :** Poudre des pelures du fruit du grenadier

1.3.Méthodes d'analyses :

Notre étude s'est articulée autour de trois axes majeurs :

- Analyse physico-chimique de l'écorce de la grenade.
- Caractérisation des composés phénoliques :
 - ✓ Extraction des composés phénoliques.
 - ✓ analyses spectrophotométrique des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des tanins hydrolysables.
 - ✓ Analyse chromatographique : Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)
- Étude, in vitro de l'activité antioxydante des extraits phénoliques.

Le diagramme ci-dessous illustre en générale de la démarche suivie pour la réalisation de cette étude :

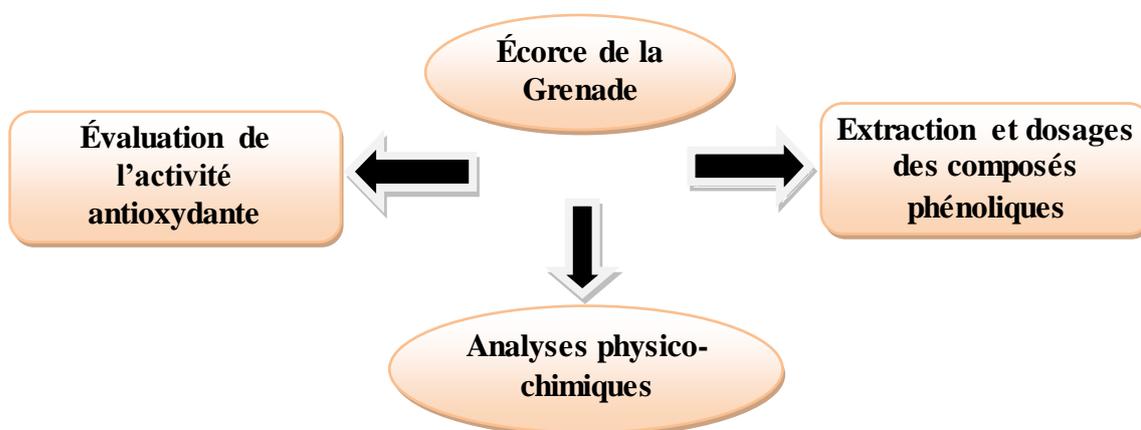


Figure n° 16 : Diagramme générales des dosages effectuer.

1.3.1. Caractérisation physico-chimiques :

1.3.1.1. Détermination de la teneur en eau :

La teneur en eau est déterminée par la méthode de référence (NA 1213 /1992).

a. Principe :

La teneur en eau est déterminée par dessiccation d'un échantillon de 2g dans une étuve isotherme à une température de $103^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ et à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon. La teneur en eau est égale à la perte de masse subie dans les conditions de mesure (Audigie, 1978). La détermination de la matière sèche sera réalisée juste à l'arrivée des échantillons au laboratoire.

b. Mode opératoire :

- Préparer les vases à tare, les mettre dans l'étuve ($103^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) durant 15 min, en les laisser refroidir et les peser ;
- Peser 2g de chaque échantillon dans chaque vase à tare ;
- Sécher les échantillons dans l'étuve à ($103^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) pendant 3 heures, laisser refroidir au dessiccateur pendant 30 min.

c. Expression des résultats :

La teneur en eau (H%) est donnée par la relation suivante :

$$H\% = (P - P1) / M \cdot 100$$

P : masse en g de la prise d'essai avant séchage.

P1 : masse en g de la prise d'essai après séchage.

M : masse du matériel biologique.

A partir de la teneur en eau, on détermine le taux de matière sèche qui est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de matière sèche (MS\%)} = 100 - \text{teneur en eau (H\%)}$$

1.3.1.2. Détermination du pH :

a. Principe :

La détermination de la différence de potentiel entre deux électrodes en verre, plongées dans une solution aqueuse de poudre de pelure à analyser.

Le pH mètre de type (**Inlabo Multi 720**) utilisé, permet une lecture directe du pH de la solution analysée.

b. Mode opératoire :

Régler le système de correction de la température du pH-mètre

-étalonner le pH-mètre en utilisant deux solutions tampons l'une à $\text{pH} = 7.00 \pm 0.02$,

T (20°C) et l'autre à $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$, T (20°C) ; pour une mesure précise, et afin de compenser la diminution de la sensibilité de l'électrode due ; au vieillissement.

-rincer l'électrode avec de l'eau distillée.

-essuyer l'électrode avec du papier Joseph.

- introduire l'électrode dans la prise d'essai préalablement homogénéisée

-lire le pH directement sur l'échelle de l'appareil lorsqu'une valeur constante a été obtenue

-effectuer deux déterminations sur cinq prises d'essai séparées provenant du même échantillon préparé.

1.3.1.3. Détermination de la teneur en matière grasse (ISO 659, 1998) :

a. Principe :

L'extraction par solvant organique (Hexane), spécifique pour la détermination du taux de la matière grasse est réalisée avec un appareil de type Soxhlet (**Figure 17**).

A la fin de l'extraction, on peut admettre que toute la matière grasse est transférée dans le solvant.

b. Mode opératoire :

Il a été effectué selon la méthode **ISO 659, 1998**.

- Sécher 3g d'échantillon à l'étuve à 105 °C pendant 3 h ;
- Placer l'échantillon sec dans une capsule de cellulose, l'échantillon est extrait en continu par de l'hexane à l'ébullition qui dissout graduellement la matière grasse.
- Le solvant s'évapore et la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, la matière grasse est pesée.

c. Expression des résultats :

Le taux de la matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$\text{MG (\%)} = (P-P1) / ME \cdot 100$$

Dont :

P2 : poids du ballon vide.

P1 : poids du ballon après évaporation.

ME : masse de la prise d'essai.

MG : taux de la matière grasse.

100 : pour exprimer le pourcentage.



Figure n°17 : appareil à Soxhlet.

1.3.1.4. Détermination de la teneur en cendres :

La méthode utilisée est celle de minéralisation par calcination (**Laurent, 1991**).

a. Principe :

C'est la méthode la plus simple, elle consiste à un passage au four à une température de 400 à 600 °C jusqu'à destruction totale de toute particule carbonneuse (**Laurent, 1991**).

b. Expression des résultats :

La détermination de la teneur en matière organique se fait par le calcul de la différence de poids selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en matière organique (MO\%)} = ((M_i - M_f) / P) * 100$$

Où :

MO% : Teneur en matière organique ;

M_i : Masse initiale (avant calcination) ;

M_f : Masse finale (après calcination) ;

P : Masse de la prise d'essai ;

Le taux des cendres est calculé selon la relation suivante :

$$\text{Teneur en cendres (C\%)} = 100 - \text{MO\%}.$$

1.3.1.5. Dosage des sucres totaux :

a. Principe :

Le dosage des sucres totaux est effectué par la méthode de phénol / acide sulfurique (**Dubois et al., 1956**).

Cette dernière nécessite une hydrolyse acide qui permet la rupture de toutes les liaisons glucidiques dans le polysaccharide.

Le principe du dosage se base sur la condensation des produits de déshydratation des oses avec un chromogène qui est le phénol. A ce moment-là, il se forme des chromophores de couleur jaune-orange, leur apparition est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 490nm.

La teneur des sucres est exprimée en $\mu\text{g} / \text{ml}$ (convertie en grammes / litre) de α D (+) Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage.

b. Mode opératoire :

• Préparation de l'échantillon :

- On additionne à 0,5g d'échantillon, 20 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) 0,5 M, puis on place l'ensemble dans une étuve réglée à 105°C pendant 3 heures ;
- on transpose la solution dans une fiole de 500ml tout en ajustant le volume par de l'eau distillée jusqu'à 500ml ;
- on filtre la solution puis on réalise trois dilutions au 1/3 ;
- dans des tubes, on met 1ml de chaque dilution, ensuite on ajoute dans chaque tube 1ml de phénol à 5 % et 5ml d'acide sulfurique H_2SO_4 à 98% ;
- les tubes sont maintenus dans l'étuve pendant 5 minutes à 105°C , puis laissés dans l'obscurité pendant 30 minutes ;
- enfin, à l'aide d'un spectrophotomètre, on lit la densité optique à une longueur d'onde de 490 nm.

En parallèle, on trace la courbe d'étalonnage de la façon décrite dans l'**annexe n° 2**.

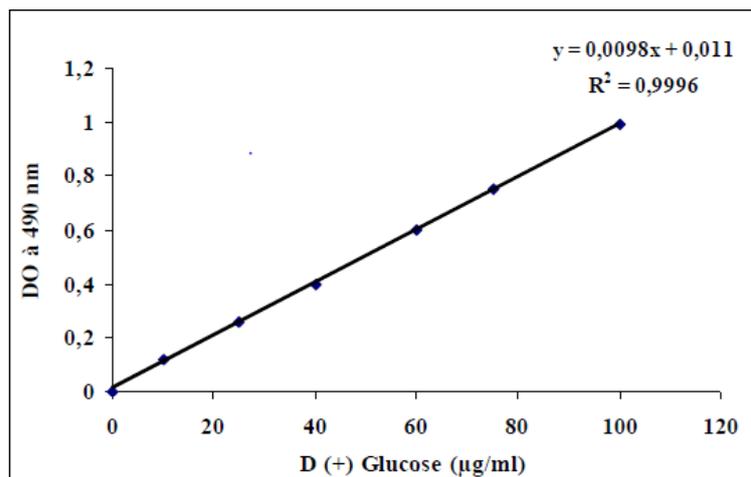


Figure n°18: Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux.

1.3.1.6. Dosage des protéines : (Kjeldahl, 1883) :

a. Principe :

Pour déterminer la quantité des protéines contenues dans un échantillon, on procède à un dosage de l'azote total par la méthode de **Kjeldahl**. Cette dernière s'effectue en trois phases :

- minéralisation ;
- distillation ;
- titration.

b. Mode opératoire :

- **Minéralisation :**

Dans un matras de **Kjeldahl**, on introduit :

- 1 g du matériel biologique broyé.
- 2 g de catalyseur (**annexe n°3**).
- 25 ml de H₂SO₄ concentré à 97 %.
- 2 ml d' d'H₂O₂ (eau oxygénée) à 30 %.

On chauffe le matras jusqu'à ce que la couleur noire se transforme en une couleur limpide. A ce moment-là l'azote organique est transformé en azote minéral.

Ensuite, on laisse refroidir et on transpose l'échantillon minéralisé dans une fiole, on lave le matras avec de l'eau distillée tout en ajustant le volume jusqu'à 100 ml.

- **Distillation :**

Elle se fait dans une unité de distillation **BÜCHI Distillation Unit B-324**.

Dans un matras, on introduit 10 ml du contenu de la fiole auquel on additionne 20 ml d'eau distillée et 30 ml de la soude à 35 %.

En parallèle, on prépare une solution d'acide borique à 0,1N avec 10 gouttes d'Indicateur de Tashiro (de couleur rose- violette en présence d'un milieu acide et verte dans le cas d'un milieu alcalin) (**annexe n° 3**).

La distillation s'effectue dans un appareil spécifique, elle est arrêtée au bout de 4 minutes à compter du début d'ébullition.

- **Titration :**

Puisqu'on utilise l'acide borique comme solution de récupération, on va alors titrer l'excès des anions de borate avec la solution de HCl à 0,1N jusqu'à changement de la coloration du vert au rose-violet dû au virage de l'indicateur de Tashiro.

c. Expression des résultats :

L'azote total est calculé suivant la formule représentée ci- dessous :

$$\text{Azote total (N) (\%)} = \frac{(\text{VB} - \text{VE}) \cdot \text{F} \cdot 0,0014 \cdot 10 \cdot 100}{\text{M}}$$

Dont :

VB : Volume de NaOH 0.1N utilisé pour un essai blanc (ml).

VE : Volume de NaOH 0.1N utilisé pour la titration de la solution à doser (ml).

F : Facteur de correction.

100 : coefficient du pourcentage

10 : coefficient du volume total de la solution à doser

M : masse de la prise d'essai.

Le taux d'azote total est converti en taux de protéines brutes selon la formule suivante :

$$\text{Taux de protéines brutes (\%)} = \text{N total (\%)} \times 6,25$$

Où 6,25 est le facteur de conversion basé sur le taux moyen d'azote des protéines.

1.4. Extraction des polyphénols :

Les opérations d'extractions des composés phénoliques, à partir du matériel végétal sont primordiales avant de passer à leurs analyses qualitatives et quantitatives.

1.4.1. Préparation de l'extrait brut méthanolique :

L'extrait méthanolique a été obtenu en se référant à la méthode de macération simple qui permet d'effectuer une extraction solide-liquide avec une grande efficacité (Mariana *et al.*, 2010).

- 20g de la poudre végétale est mise dans 100 ml de méthanol.
- Le mélange matière végétale - méthanol est agité pendant 24 heures par un agitateur magnétique, la solution obtenue subit deux filtrations successives sur papier filtre moyen (mm) ; le filtrat obtenu est macéré pour une deuxième fois.

Après l'extraction, le solvant riches en substances extraites a été récupéré dans un ballon, puis passé au rotavapor afin d'évaporer le solvant (voir figure ci-dessous)



Figure n°19 : évaporation du solvant (méthanol) au Rotavapor.

- L'extrait obtenue est lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur de type Telstar à une température de (-47°C) à (-48°C) (**figure n°20**). Le lyophilisat obtenu est une poudre de couleur brun clair, il est conservé à 4 °C dans un flacon hermétiquement fermé jusqu'à l'utilisation.



Figure n° 20: Lyophilisation de l'extrait méthanolique de la grenade.

1.4.2. Rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction exprime le rapport entre le poids du résidu sec de l'extrait méthanolique et le poids du produit à traiter. Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

Avec :

P_0 : poids du ballon vide (g)

P_1 : poids du ballon après évaporation du solvant (g)

E : poids de l'échantillon en poudre (g).

1.5. Analyse des extraits des pelures du fruit de *Punica granatum*

L :

Les essais chimiques de caractérisation ont porté sur la recherche dans les différents extraits des principaux groupes de composés phénoliques. Ces essais

permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition de ces extraits.

1.5.1. Réactions de caractérisations des composés phénoliques :

➤ Caractérisation des Flavonoïdes :

La détection de la présence des flavonoïdes dans les extraits du fruit de *Punica granatum L* a été faite par la réaction à la cyanidine (**Ciulel, 1982**). Pour chaque extrait, on ajoute quelques gouttes d'HCl et quelques fragments de magnésium. Le test est positif lorsqu'on obtient la couleur rose orange.

➤ Caractérisation des Tanins :

Pour détecter la présence des tanins, on ajoute à chaque extrait quelques gouttes de Chlorure ferrique (FeCl_3) à 1%. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (**Diallo et al., 2004**).

1.5.2. Techniques d'analyses :

Après leur extraction, les polyphénols sont soumis à une étude quantitative et qualitative.

1.5.2.1. Analyse qualitative :

L'analyse qualitative est réalisée par la chromatographie, qui est un ensemble de méthodes de séparations basés sur différents principes physiques, elle sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide), le long d'une phase stationnaire (solide).

Suivant la disposition du support de chromatographie on distingue : (**Bruneton, 1993**).

- La chromatographie sur papier (de partage) ;
- Chromatographie phase gazeuse ;
- La chromatographie sur couche mince (d'adsorption) ;
- La chromatographie liquide à haute performance.

Par manque de disponibilité de moyens, nous avons utilisé, pour notre travail un seul type de chromatographie, qui est la dernière chromatographie.

- **Dosage par chromatographie liquide à haute performance HPLC –RP-C18 :**

Dans le cadre d'identifier les polyphénols existants dans l'extrait brut, l'analyse est réalisée par un HPLC, le besoin d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige le remplacement des méthodes traditionnelles par des techniques séparatives. L'HPLC est sans doute la technique analytique la plus utile pour caractériser les composés polyphénoliques (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).

C'est une technique très fiable et très pratique pour la séparation de très faibles quantités de produits non volatiles (comme les polyphénols) dans les mélanges les plus complexes.

Dans le cadre de notre étude, nous avons opté pour une méthode de choix très précise (VP SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH) qui a été réalisé au niveau du laboratoire physico-chimique du complexe antibiotique SAIDAL Médéa.

a. Principe :

20 µl de chaque extrait ont été injectés sur une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à (125x 4.6 mm). La phase mobile est constituée de trois éluant : l'eau distillée, méthanol, acide acétique (50 : 47 : 2.5) (V / V / V). Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique étalé sur 10 min. Le débit est de 1 ml / min (**Amarowicz et al., 2005**). La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde égale 254 nm.

b. Expression des résultats :

Les flavonoïdes contenus dans chaque extrait analysé ont été identifiés par la comparaison des temps de rétention obtenus par ceux des témoins.

1.5.2.2. Analyse quantitative :

• Dosage spectrophotométrique :

C'est une méthode couramment employée pour la détermination de la concentration d'un composé qu'il soit natif ou qu'il résulte d'une hydrolyse acide.

Au cours de notre travail nous avons utilisé le spectrophotomètre U.V – visible (type Shimadzu UV mini 1240).

Le protocole que nous avons suivi pour la mesure des densités optiques est celle de Folin-Ciocalteu (**Li et al., 2006**).

Il s'agit d'une méthode analytique biochimique nécessitant la prise d'échantillons, l'extraction des composés phénoliques à partir de ces échantillons puis d'une mesure spectrocolorimétrique des extraits.

1.5.2.2.1. Estimation quantitative des polyphénols totaux :

La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu qui a été décrite dès 1965 par (**Li et al., 2006**). Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses.

a. Principe :

Le réactif de folin-ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 770 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

L'acide phénolique standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique ($C_7H_6O_5$), Ce dernier étant un composé organique aromatique largement répandu dans les plantes soit sous forme libre, soit comme composant des gallotanins, sa formule chimique est la suivante (**figure n°21**) :

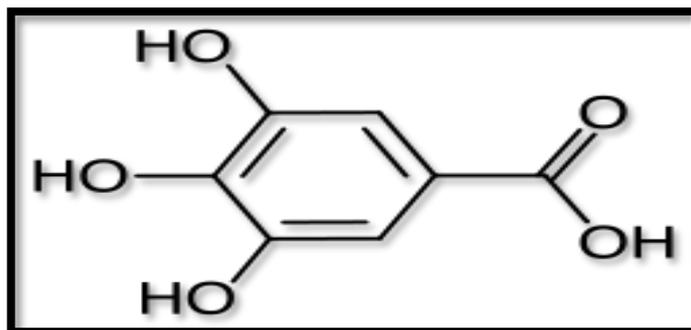


Figure 21 : Formule semi-développée de l'acide gallique (acid 3, 4, 5 trihydroxybenzoïque)

b. Mode opératoire :

- Prendre un volume de 0,25 ml d'extrait dilué mélangé à 1,25 ml de réactif de Folin-ciocalteu.
- Après 3 minutes de temps de réaction de ce mélange, ajouter 1 ml de la solution de carbonate de Sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 75g/l.
- Après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance est lue à 765 nm.
- Un blanc est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait méthanoliques par le méthanol.
- L'expérience est répétée trois fois pour chaque concentration d'extrait dilué.
- On procède par les mêmes étapes pour l'obtention de la courbe d'étalonnage du standard (l'acide gallique) de 20-100 $\mu\text{g/ml}$ afin de déterminer la teneur en polyphénols totaux.

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

1.5.2.2. Estimation quantitative des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes est estimée selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) modifiée (Lamaison et Carnet, 1990).

a. Principe :

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe avec les flavonoïdes dont le dosage est à une absorbance de 430 nm.

La quercétine ou quercétol ($C_{15}H_{10}O_7$) est le flavonoïde standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes, dont la formule chimique est la suivante (**figure n°22**).

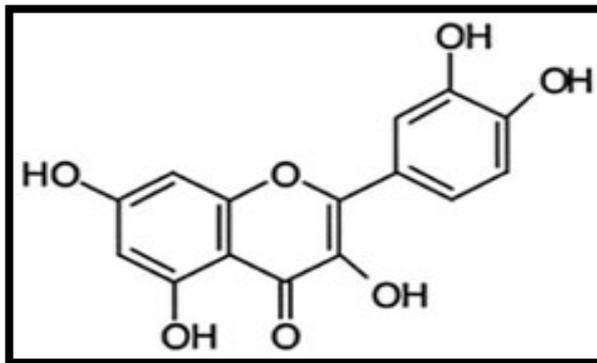


Figure n°22 : formule chimique de la quercétine.

b. Mode opératoire :

- Ajouter 1ml d'extrait dilué à 1ml de la solution de chlorure d'aluminium
- Après 1 heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 430 nm.
- L'expérience est répétée 3 fois pour chaque concentration d'extrait dilué.
- On procède par les mêmes étapes pour l'obtention de la courbe d'étalonnage du standard (la quercétine) afin de déterminer la teneur flavonoïdes.
- La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine qui sera exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait.

1.5.2.2.3. Estimation quantitative des Tanins hydrolysables

Les anthocyanines ont été déterminées selon la méthode de **Willis et Allen (1998)** modifié par **Çam et Hisil (2010)**:

- Dans un tube à essai, 1 ml de l'extrait dilué dix fois et 5ml de KI03 à 2,5% sont mélangés et vortexés pendant 10 secondes.

- Le temps de réaction optimal pour obtenir la valeur maximale d'absorbance a été déterminé de 2 minutes pour les extraits de peau de grenade et de 4 minutes pour les solutions étalons de l'acide tannique.
- L'absorbance du mélange de couleur rouge a été déterminée à 550 nm contre le blanc (eau distillée).
- Six concentrations différentes de solutions d'acide tannique sont préparées pour l'étalonnage.
- Les résultats finaux sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par g de matière sèche (mg EAT/g MS).
- Tous les dosages ont été réalisés en triplicata (3 répétitions pour toutes les concentrations).

1.6.Évaluation de l'activité biologique des extraits végétaux étudiés :

1.6.1. Évaluation in vitro de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH) et superoxydes (O_2).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) ; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) ; ou les radicaux ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH (diphényl-picrylhydrazyle).

Dans notre étude, l'activité antioxydante des extraits végétaux étudiés a été évaluée in vitro par deux méthodes de référence : le pouvoir réducteur et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2-2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).

Le pouvoir antioxydant de ces extraits a été comparé à un antioxydant de synthèse qui est le BHT.

1.6.1.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH :

a. Principe :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques, 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, le 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 (**figure n° 23**).

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 une absorbance de 515 à 518 nm (**Sanchez-Moreno, 2002**).

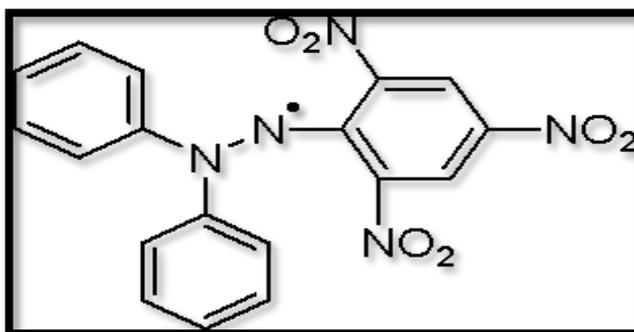
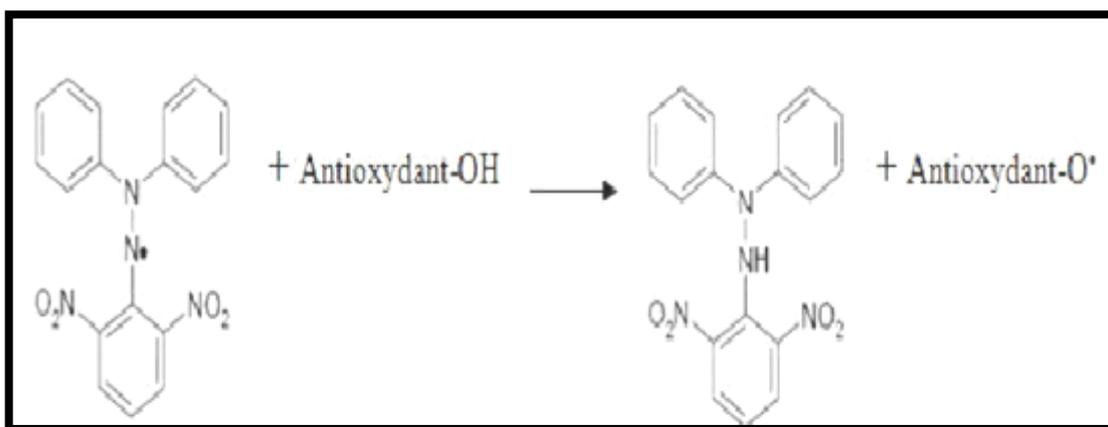


Figure n°23 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2 Diphényl-1-Picryl-Hydrazyle).

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes :

- la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques).
- la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes).

Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH, alors, transformé en une molécule stable DPPH-H (figure n°24).



DPPH (violet)

DPPH-H (jaune)

Figure n°24 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.



Figure n°25 : Solution de DPPH après réaction avec l'extrait phénolique.

b. Mode opératoire :

Le test utilisant le radical DPPH est réalisé, en suivant la méthode décrite par **Sahin *et al.* (2004)**.

25 µl de la solution méthanolique de l'extrait phénolique et 0.975 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.0024 g/100 ml méthanol) sont ajoutés dans une cuvette après incubation pendant 30 min et l'absorbance a été mesuré à 517 nm contre le méthanol. L'expérience est répétée 3 fois pour chaque concentration d'extrait dilué.

Le pourcentage d'activité antioxydante (I%) est calculé selon la formule suivante :

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

A_{blanc} = Absorbance du témoin (nm): c'est l'absorbance du DPPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon (extrait méthanolique) à une concentration donnée.

$A_{\text{éch}}$ = Absorbance de l'échantillon testé après 30 minutes.

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant standard.

1.6.1.2 Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50) :

Elle est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

1.6.2 Mesure du pouvoir réducteur :

L'aptitude des extraits végétaux à réduire le fer ferrique est évalué par la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**.

a. Mode opératoire :

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons (les extraits végétaux) est obtenue en suivant le protocole expérimental représenté par la **figure n °26**.

- L'expérience est répétée 3 fois pour chaque concentration de l'échantillon testé ;
- L'augmentation de l'absorbance indiquera une augmentation du pouvoir réducteur de l'échantillon.

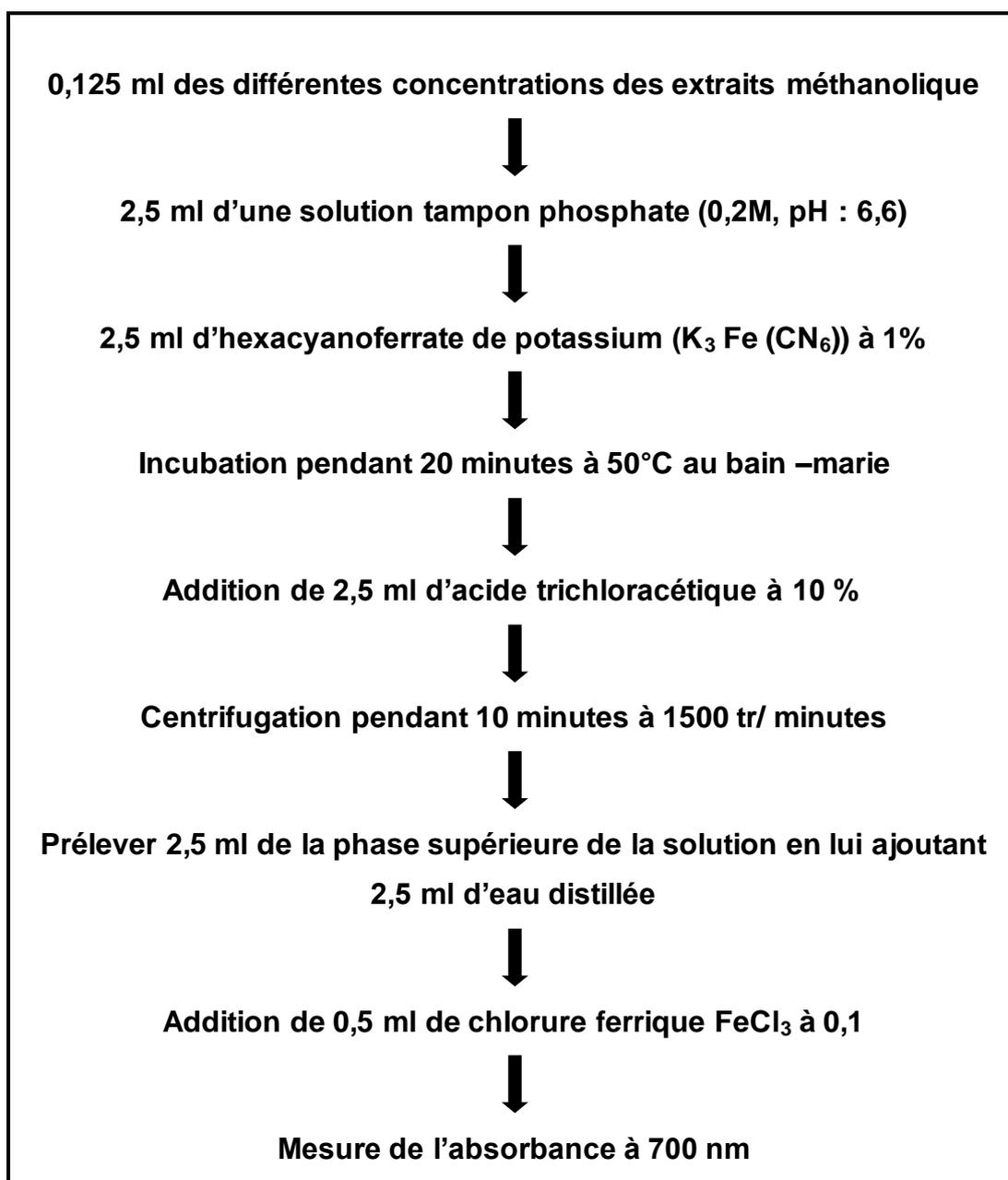


Figure n°26 : Les étapes d'évaluation du pouvoir réducteur.

- Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par le méthanol. le BHT à différentes concentrations est utilisé comme standard.
- Une absorbance élevée indique un pouvoir réducteur élevé.

La concentration en extrait fournissant 0.5 d'absorbance (EC50) ou la concentration effective a été calculée à partir du graphique de l'absorbance à 700 nm contre la concentration en extrait (**Ferreira *et al.*, 2007**).

1.7. Analyses statistiques :

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'analyse physico- chimique ont fait l'objet d'une analyse descriptive à l'aide du logiciel Excel 2007.

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antioxydante et pouvoir réducteur des extraits phénoliques ont fait l'objet d'une analyse statistique à l'aide de deux Logiciels ANOVA (test de Fisher) et Excel 2007.

Les valeurs de la concentration inhibitrice à 50% (IC50) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration).

Chapitre II

Résultats et discussion

Ce chapitre présente tous les résultats obtenus au cours des expériences effectuées ainsi que leurs interprétations et discussions.

2.1. Analyses physico-chimique :

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur les deux variétés de l'écorce de la grenade sont représentés dans le **tableau10** :

Tableau 10 : composition biochimique du grenade (en % de la matière végétale).

Paramètres	Variété Doux de Koléa ^a	Variété de Doux deMessad ^a
Humidité %	7,12± 0,24	7,28± 0,53
PH	4,34 ±0,01	4,31 ±0,01
Sucre totaux %	4,27±0,03	3,46±0,03
Protéine %	0,55 ±0 ,02	0,55 ±0,02
Taux de cendre %	6,76 ±0,75	6,32 ±0,03
Matière grasse %	0,52 ±0,03	0,95 ±0,09

^a : valeur en moyenne ±écart-type.

2.1.1.Teneur en humidité :

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches pour elles renferment 60 à 80%. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10% (**Paris et Moyse, 1965**). Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans la poudre pelures sèches de nos plantes, C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

La peau fraîche des deux variétés de la grenade donne une teneur en eau (**7,12 ± 0,24%**) et (**7,28 ± 0,53%**) pour l'espèce de Doux de Koléa et Doux de Messad respectivement.Ces résultats sont comparables avec celle trouvés par **Wenjuan Qu et al., (2012) 7,43%** pour l'écorce fraîches.

D'autre auteur ont étudiées l'écorce sèche, la teneur en humidité est estimée entre 10 et 30%.

La variation de la teneur en eau peut être due aux :

- différences des variétés ;
- expositions à différentes conditions pédoclimatiques ;
- stade de maturation ;
- répartition géographique.

2.1.2. pH :

Est le potentiel d'hydrogène, il représente la concentration en ions H⁺ dans le milieu.

On remarque que le pH des écorces de la grenade est de **(4,34 ±0,01)** pour la variété de Doux de koléa et **(4,31 ±0,01)** pour Doux de Messad, c'est un pH acide.

Ces valeurs sont comparables avec celles données par **Gozlekci et al., (2012). 4,56** et avec celle donnée par **Ali Tahnifar et al., 2010** et **Nasseur et al., 2012** qui est de **4,09** et **3,75** respectivement.

2.1.3. Teneur en lipides :

Les lipides sont des constituants biologiques nutritionnellement importants du point de vue calorique et de l'apport en acide gras essentiels ainsi qu'en vitamines liposolubles, ce sont des matières organiques insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques.

De multiples paramètres influent sur le taux de matière grasse comme la granulométrie, l'humidité, la nature du solvant et la méthode d'extraction utilisée.

La teneur en lipide pour les deux variétés étudiées est évalués à **(0,52 ±0,03%)** et **(0,95 ±0,09%)** pour l'extrait de Doux de koléa et Doux de Messad respectivement. Ces résultats sont très inférieurs à celles trouvées par **(Nasseur et al., 2012)**, qui estiment la valeur **(9,4 ±0,1%)** pour la variété de Pakistan.

Cette différence peut être due à la variété de la grenade et les conditions édaphiques.

La variété étudiée de Doux de Koléa donne une valeur **(0,52 ±0,03%)** comparable avec celle trouvée par **Siti Nor et Adilah (2012), (0,49±0,01%)**, ce qui confère à la grenade la propriété de diminuer le risque de maladies cardiovasculaires.

2.1.4. Teneur en cendres :

La détermination de la teneur en matière minérale nous éclaire sur la qualité nutritionnelle de l'échantillon à analyser.

En effet, la teneur en cendres des aliments doit avoir un seuil à ne pas dépasser pour la consommation humaine et animale.

Les résultats obtenus pour la teneur en cendres des écorces de la grenade étudiées sont **(6,76 ±0,75%) pour** l'échantillon de Doux de Koléa et **(6,32 ±0,03%)** Doux de Messaad.ces valeurs sont supérieures à celle donnée par **Nasseur et al., 2012** et **Michel aviran et al., 2008** estimé de **(5,00±0,14%)** et **2%** respectivement.

Ces différences peuvent être dues à certains facteurs écologiques, l'âge de la plante, la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques.

2.1.5.Sucres totaux :

Les résultats du dosage des sucres totaux au niveau de la pelure de la grenade représentent **(4,27±0,03%)** pour le doux de koléa et **(3,46±0,03%)** pour le doux de Messad.ces valeurs sont comparables avec celle trouvée par **Nasseur et al., (2012)** qui ont trouvé **3,13±0,3%**.

Siti Nor et Adilah (2012) et Cristobal Noé et al., 2008 qui ont trouvés (**9,2 et 9.64±0.29 %**) respectivement.

La teneur en sucre totaux dans les écorces étudiées présente une faible valeur ce qui confère aux pelures leur goût amer.

2.1.6 .Teneur en protéines :

Les protéines tiennent une place importante dans notre alimentation. En effet, pour l'Homme et l'animal, le besoin en protéines est d'environ 12 à 15% de la matière sèche du régime alimentaire, suivant l'espèce et l'état physiologique. Elles sont fournies essentiellement par les graines de céréales et des légumineuses.

La teneur en protéines brutes est l'un des critères utilisés pour évaluer la valeur nutritive d'un aliment. La teneur en protéines dépend sans aucun doute des conditions pédoclimatiques ainsi que du stade de développement de la plante.

Le taux de protéine est estimé à **(0,55 ±0,02%)** pour les deux variétés analysées, cette valeur est comparable avec celle trouvée par **Siti Nor et Adilah(2012)** qui est **(0,75 ±0,04%)**. En effet **Nasseur et al., (2012)** donne une valeur de **(6,719 ±0,10%)**.

2.2. Rendement d'extraction :

La polarité d'un solvant en dehors du moment dipolaire, la polarisabilité et la liaison d'hydrogène déterminent quel type de composés est capable de dissoudre **(Wang et al., 2011)**.

Les antioxydants à bases de plantes sont extraits des matières ou des déchets de l'industrie alimentaires par les solvants organiques tels que le méthanol, l'acétone et l'éther diéthylique. le méthanol est un extracteur efficace pour une large gamme de polyphénols, donc c'est un solvant fréquemment utilisé à l'échelle de laboratoire et industrielle .il est facilement accessible et à bon marché **(Wang et al., 2004)**.

Le **tableau ci-dessous** représente les rendements en extraits méthanoliques exprimés (g d'extrait/100g de matière végétale).

Tableau n°11: Rendement en extraits méthanolique de quatres espèces de grenade (en % MS)

Espèces	Provenance	Rendement en extrait %
<i>Punica granatum</i>	Doux de Koléa (1)	27,5
<i>Punica granatum</i>	Doux de Messad (2)	35,8
<i>Punica granatum</i>	Californie (3)	22,9
<i>Punica granatum</i>	Inde (4)	9 ,38

(1):Echantillon étudié Doux de Koléa;

(2) :Echantillon étudié Doux de Messad ;

(3) :(Wenjuan Qu et al., 2010) ;

(4) :(Singh R P et al., 2001) ;

D'après le **tableau n°11** ci-dessus on constate que le rendement d'extraction obtenus à partir de l'échantillon étudié de Messad (**35,8 g /100g de MS**) est supérieur à celui de Koléa (**27,5 g /100g de MS**) et à celui de la même espèce (**22,9g /100g de MS**) originaire de la Californie. et de l'Inde (**9 ,38 g /100g de MS**).

Le rendement en extrait méthanolique peut varier au sein de la même espèce en fonction de l'origine, de la période de récolte de la plante, de la méthode d'extraction ainsi que des conditions sous lesquelles cette dernière a été effectuée.

Singh et al., (2002) ont extrait les antioxydants à partir de l'écorce de la grenade et de la pulpe en utilisant du méthanol, de l'acétone ou de l'eau. Ils ont constaté que le méthanol a donné un meilleur rendement.

Iqbel et al., (2008) ont observé que le rendement le plus élevé est obtenu avec le méthanol suivi de l'éthanol, de l'acétone, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et de l'eau, respectivement. Ces résultats ont confirmé ceux obtenus précédemment par **Iqbel et al., (2005)**, qui ont rapporté que le méthanol est habituellement recommandé pour l'extraction des composé antioxydants.

L'extraction des polyphénols de grenade par une macération avec le méthanol pure a donné un rendement de **35,8% et 27,5%** de la matière végétale. Comparativement à certaines études (**tableau n°12**) ce mode d'extraction apparait très efficace dans l'extraction des antioxydants de la peau de grenade.

Auteur	Solvants	Rendements (%MV)
Okonogi et al.(2007)	Ethanol à 95%	6,21%
Sultana et al.(2008)	Méthanol 80%	29,9%
Iqbel et al .(2008)	Méthanol	29%
	Acétone	27%
	Ethanol	21%
Li et al.(2006)	Mélange de solvants	31.5%

Tableau n°12 : rendement en extrait sec de peau de grenade rapporté par certains auteurs.

Cette variation de rendement d'extraction peut s'expliquer par la différence de la région de provenance de chaque variété.

2.3. Analyse des extraits des pelures du fruit de *Punica granatum* L :

2.3.1. Réactions de caractérisations des composés phénoliques :

- **Caractérisation des Flavonoïdes**

L'apparition de la couleur rose orangé dans l'extrait de Koléa et l'extrait de Messad indique la présence des flavonoïdes.

- **Caractérisation des Tanins**

Le virement de la couleur en bleu noir indique la présence des tanins galique dans les deux extraits et ainsi la présence des tanins catéchiques (brun verdâtre).

2.4. Techniques d'analyses :

2.4.1. Analyse qualitative :

Le méthanol utilisé pour l'extraction a un rôle protecteur. Il peut empêcher les composés phénoliques d'être oxydée par des enzymes, telles que des phénoloxydases.

La colonne utilisée pour séparer les composés phénoliques est exclusivement à phase inverse. Ce système est une haute technique de résolution chromatographique largement répandue, pour la séparation et la quantification simultanée des substances phénoliques (**Proestos et al., 2006**).

Les figures **27**, **28** et **29** nous donnent les chromatogrammes des différents des étalons utilisés (1 mg/ ml), les analyses sont faites à une même longueur d'onde 254. L'identification et la quantification de composés phénoliques contenus dans les extraits se fait par comparaison du temps de rétention, des surfaces des étalons utilisés rapport à ceux obtenus en analysant les extraits.

Les chromatogrammes d'HPLC des standards et des différents extraits sont représentés ci-dessous.

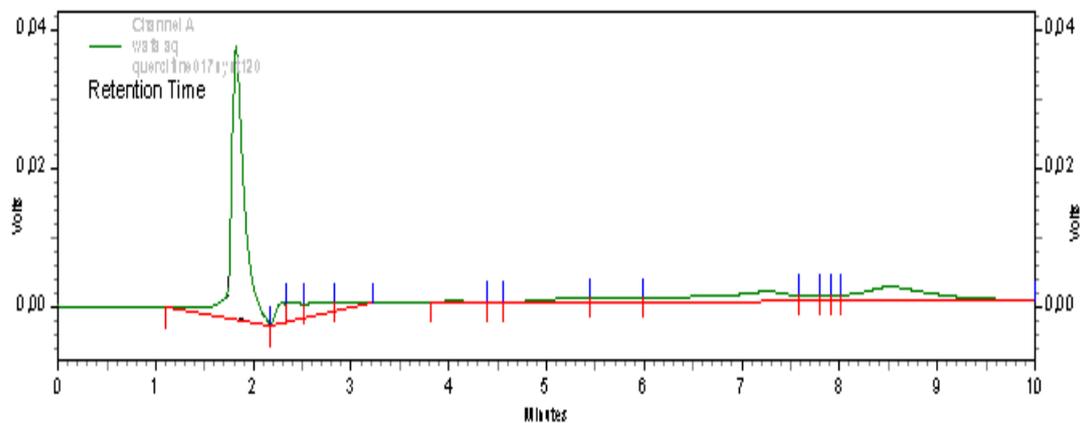


Figure n°27 : Chromatogramme d'HPLC de la quercétine enregistré à 254 nm.

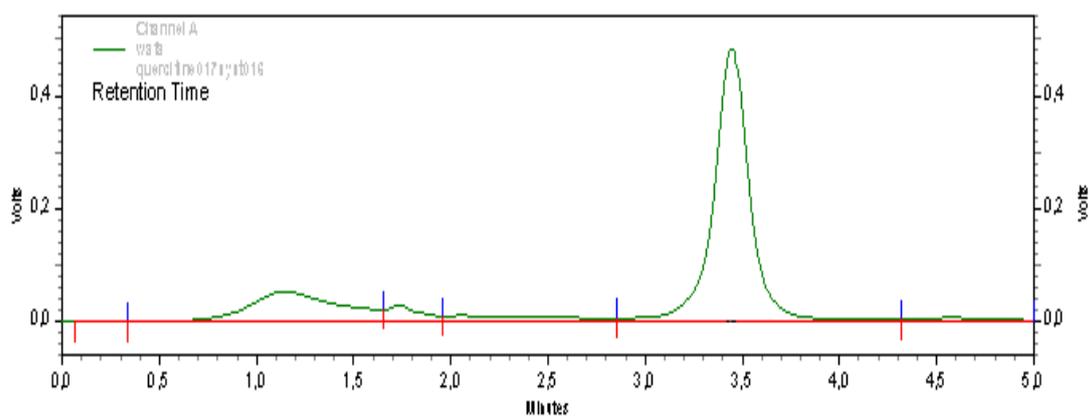


Figure n°28: Chromatogramme d'HPLC de la rutine enregistré à 254 nm.

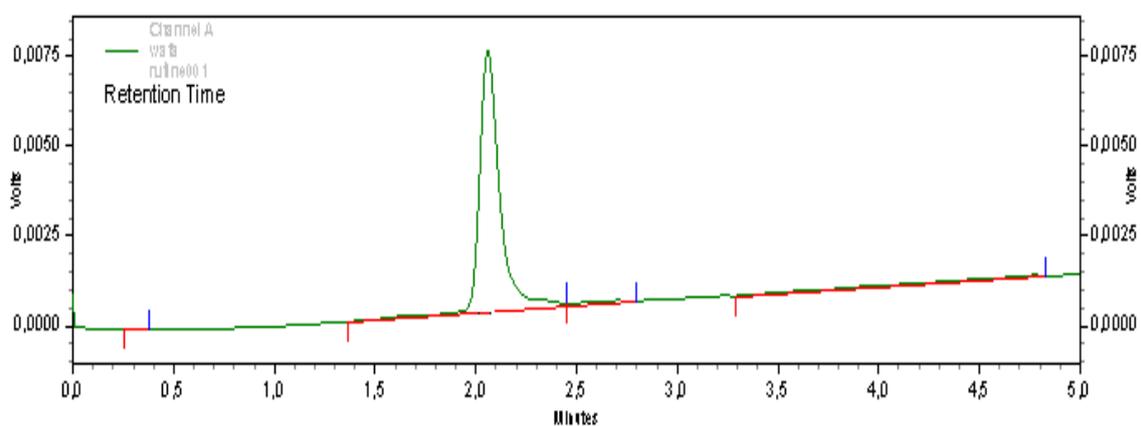


Figure n°29 : Chromatogramme d'HPLC de la catéchine enregistré à 254 nm.

Les profils chromatographiques de différents extraits de *Punica granatum* analysés sont représentés au niveau des **figures n°30** et 31.

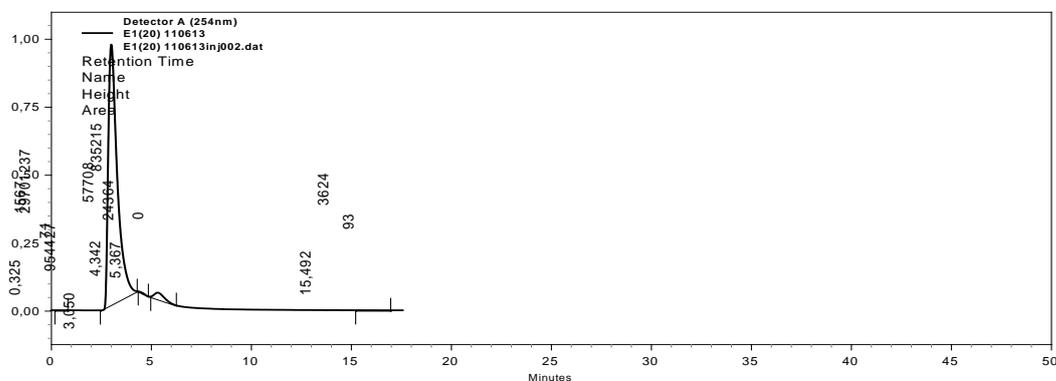


Figure n°30 : Chromatogramme d'HPLC d'extrait de Doux de koléa enregistré à 254 nm.

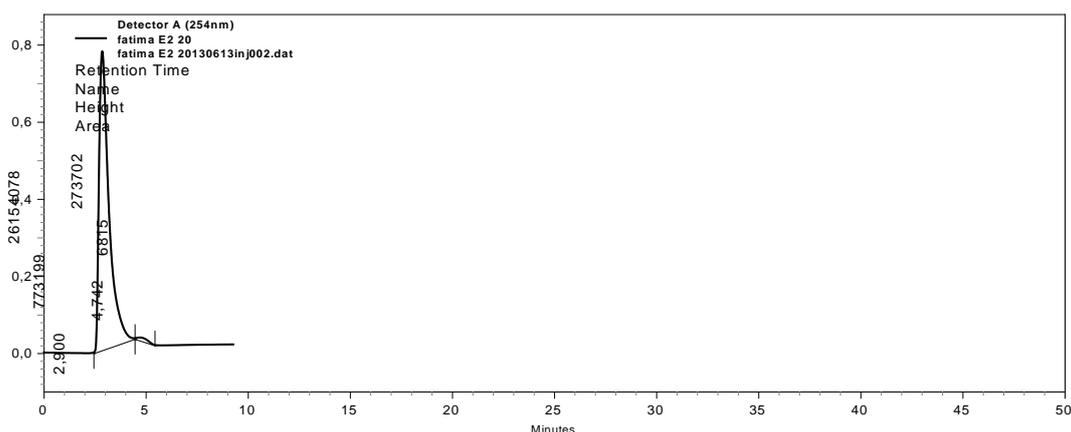


Figure n°31 : Chromatogramme d'HPLC d'extrait de Doux de Messad enregistré à 254 nm.

La comparaison des temps de rétention (Tableau n°13) des standards avec ceux enregistrés dans les différents chromatogrammes (Tableaux n°14), permet l'identification probable de certains flavonoïdes dans nos extraits (**Merken et al., 2000**).

Tableau n°13 : Temps de rétention des flavonoïdes standards :

Temps de rétention (min)	Le flavonoïde Standard
1.81	Quercétine
3.45	Rutine
2.05	Catéchine

Tableau n°14 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans les extraits de grenade.

N° de pic selon la concentration	Temps de rétention		Probable flavonoïde
	Extrait de Doux de koléa	Extrait de Doux de Messad	
0,2mg/ml	0,45	0,39	Présence de la Quercétine
	1,81	1,42	
	4,41	3,05	
	5,55	4,34	
		5,48	
0,4mg/mL	1,81	1,81	Présence de la Quercétine Présence de la catéchine
	2,05	2,05	
	3,075	3,03	
	4,308	4,31	
	5,417	5,44	
0,8mg/ml	0,325	1,81	Présence de la Quercétine Présence de la catéchine
	2,05	4,745	
	4,34		
	5,36		
	15,49		

L'analyse par HPLC des extraits des pelures de la grenade des deux variétés autochtones de la région de la Mitidja montre la présence de flavonoïdes (figures 30 et 31). La Quercétine et la catéchine sont les deux flavonoïdes identifiés dans les deux extraits de pelures.

La quercétine est présente pour un temps de rétention de **1,81** à une concentration de **0,4 et 0,8** mg/ml pour la variété Doux de Koléa, alors qu'elle est présente chez la variété Doux de Messad à une concentration de 0,4 et 0,8 mg/ml pour le même temps de rétention.

Pour la Catéchine, elle est présente pour un temps de rétention de 1,81 à une concentration de 0,8mg/ml pour les deux variétés. A une concentration de 0,8mg/ml elle est présente pour un temps de rétention de 2,05 seulement pour la variété Doux de Koléa.

Après comparaison des temps de rétention des témoins avec ceux des extraits, on constate que les deux extraits de l'écorce de la grenade semblent contenir la quercétine, la catéchine. Ce résultat est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature (**Julie Jurenka, 2008**) et (**Amira Abdel , Sherif Shaker., 2011**).

2.4.2. Analyse quantitative :

2.4.2.1. Teneur en polyphénols totaux :

La teneur en polyphénols des extraits de la plante étudiée est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue par l'acide gallique (mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait) représentée par la **figure n°32**.

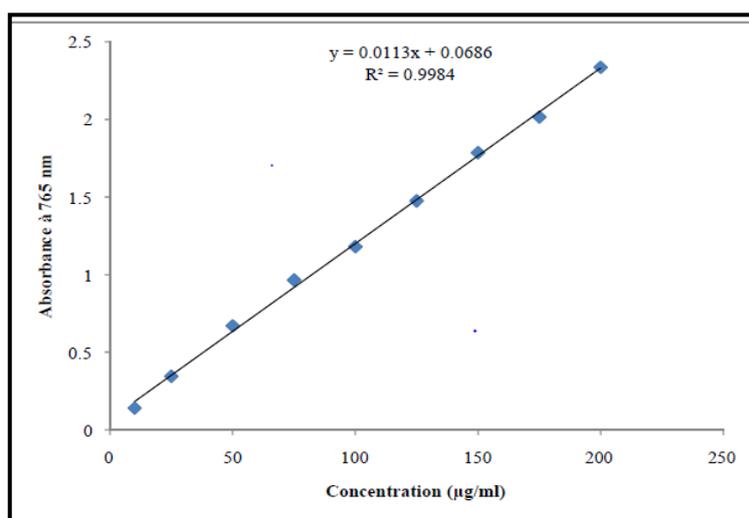


Figure 32 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Le **tableau n°15** et la **figure n°33** montre les différentes teneurs du dosage des phénols totaux des extraits méthanoliques des variétés étudiées

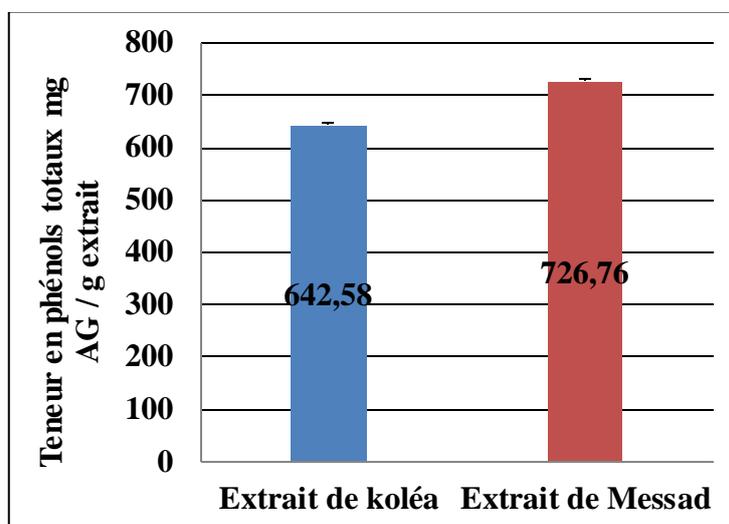


Figure n°33: teneur en polyphénols totaux des extrais méthaloniques étudiées de la peau de la grenade.

Tableau15 : Teneur en polyphénols de l'extrait méthalonique des différents échantillons de la peau de la grenade.

<i>Espèces</i>	<i>Provenance</i>	<i>Teneur en polyphénols mg.eq.AG/g MV</i>
<i>Punica granatum</i>	Koléa ⁽¹⁾	642,58±4,66
<i>Punica granatum</i>	Messad ⁽²⁾	726,76±5,08
<i>Punica granatum</i>	Iran ⁽³⁾	423,5±1,3
<i>Punica granatum</i>	Tunisie ⁽⁴⁾	181,6±5,9

(1) : Echantillon étudié Koléa;

(2) : Echantillon étudié Messad ;

(3) : (Saad H *et al.*, 2012) ;

(4) : (Ali Tehranifar *et al.*, 2010).

L'extrait méthalonique de l'écorce de la grenade étudié de Doux de Messad possède une teneur en composés phénoliques très élevée (**726,76±5,08 mg eq AG/g d'extrait**) supérieure à celle trouvée dans l'extrait de Doux de Koléa (**642,58±4,66 mg eq AG/g d'extrait**).

Ces résultats nous indiquent que les extraits étudiés sont majoritairement riches en composé phénoliques et supérieure de celles trouvés par **Ali Tehranifar et al., (2010)** qui sont de (**423,5±1,3 mg eq AG/g d'extrait**) et de (**181,6±5,9 mg eq AG/g d'extrait**) étudiés par **Saad H et al., (2012)**.

La quantité en composés phénoliques des extraits des plantes étudiés dépend essentiellement : de leur origine, de la méthode d'extraction utilisée, de la nature du solvant et du matériel végétal (**Ebrahimzadeh et al., 2008**).

Selon **Hayouni, 2007** l'utilisation des solvants polaires conduit à une teneur élevée en composés phénoliques.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**).

La teneur en polyphénols peut servir comme indicateur important de la capacité antioxydante et être utilisée comme une sélection préliminaire pour n'importe quel produit quand il est destiné comme source naturelle des antioxydants dans les aliments fonctionnels (**Viuda_Martos et al., 2011**).

2.4.2.2. Teneur en flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé en suivant la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃), en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue avec la quercétine indiquée sur la figure suivante.

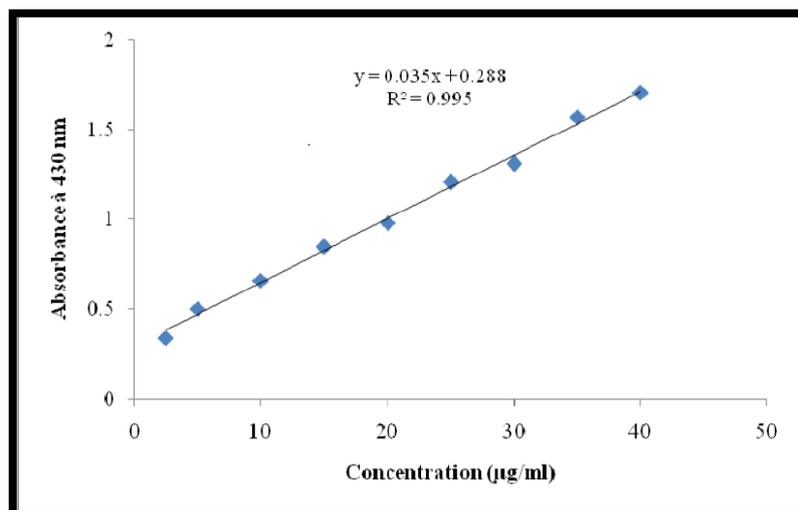


Figure n°34 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La teneur en flavonoïdes est indiquée dans le **tableau n°16** et la **figure n°35**.

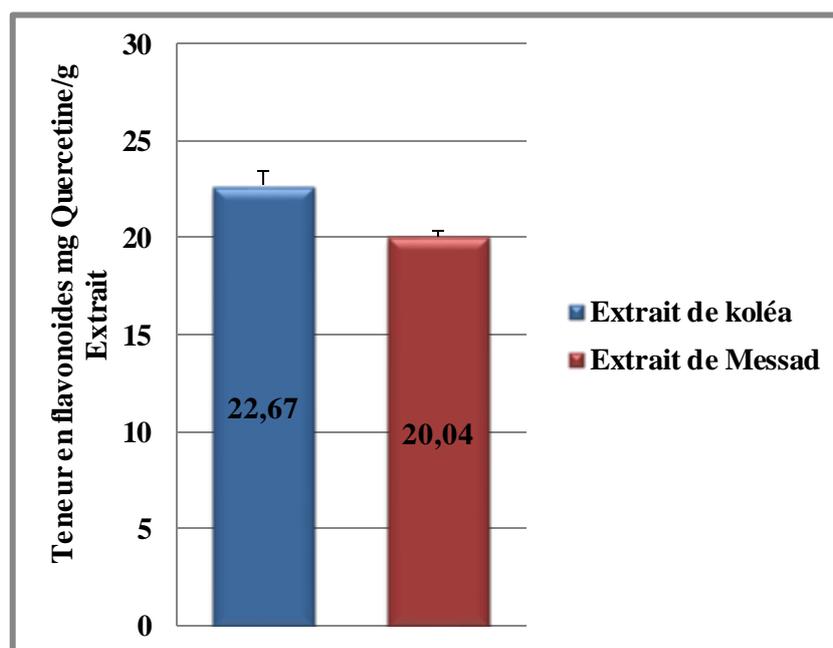


Figure n° 35 : Teneur en flavonoïdes des extraits méthaloniques de la peau de la grenade.

Tableau n°16 : Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques de la grenade.

Espèces	Provenance	Teneur en flavonoïdes mg.eq.Qr/g d'extrait
<i>Punica granatum</i>	Koléa ⁽¹⁾	22,67±0,75
<i>Punica granatum</i>	Messad ⁽²⁾	20,04±0,30
<i>Punica granatum</i>	Iran ⁽³⁾	25,05± 0,56

(1) : Echantillon étudié Koléa;

(2) : Echantillon étudié Messad ;

(3) : (Shams ardekani MR *et al.*, 2011)

D'après les résultats du tableau et de la figure ci-dessus, nous constatons que l'extrait méthanolique de l'écorce de la grenade de la variété Doux de koléa et Doux de Messad possède une faible teneur en flavonoïdes (**22,67±0,75mg.eq. Qr/g d'extrait**) et (**20,04±0,30 mg. eq. Qr/g d'extrait**) respectivement.

Ces résultats sont similaires à ceux rapporté par **Shams ardekani MR et al. (2011)** qui ont trouvé (**25,05± 0,56 mg. eq. Qr/g d'extrait**).

Li et al., (2006) ont rapporté que les flavonoïdes représentent seulement une petite partie des polyphénols présents dans l'extrait d'écorce de grenade. Il a été rapporté que l'extrait de grenade riche en ellagitanins qui sont des tannins hydrolysables.

Les teneurs en flavonoïdes des différents échantillons sont variables au sein du même genre botanique et suivant la région de provenance.

2.4.2.3. Teneur en tannins hydrolysables :

Les anthocyanines ont été déterminés selon la méthode de **Willis et Allen (1988)**, en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide tannique indiquée sur la figure suivante (**figure n° 36**).

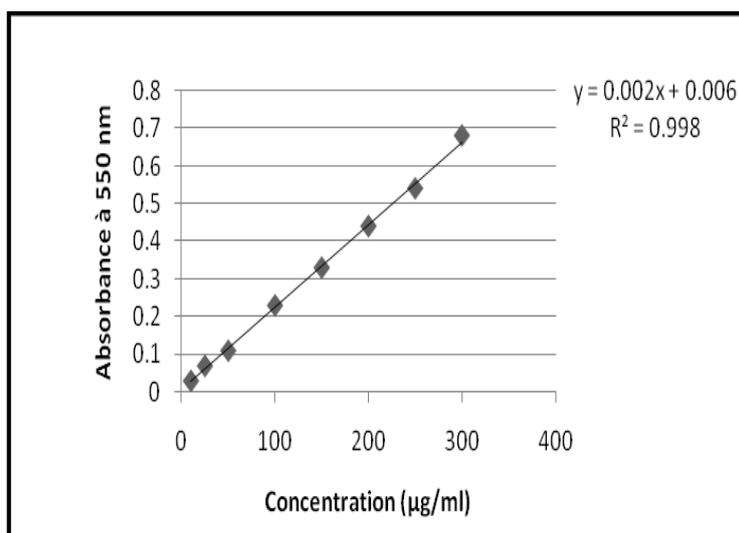


Figure n°36 : courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

La teneur en tanins hydrolysables est indiquée dans le **tableau n°17** et la **figure n°37**.

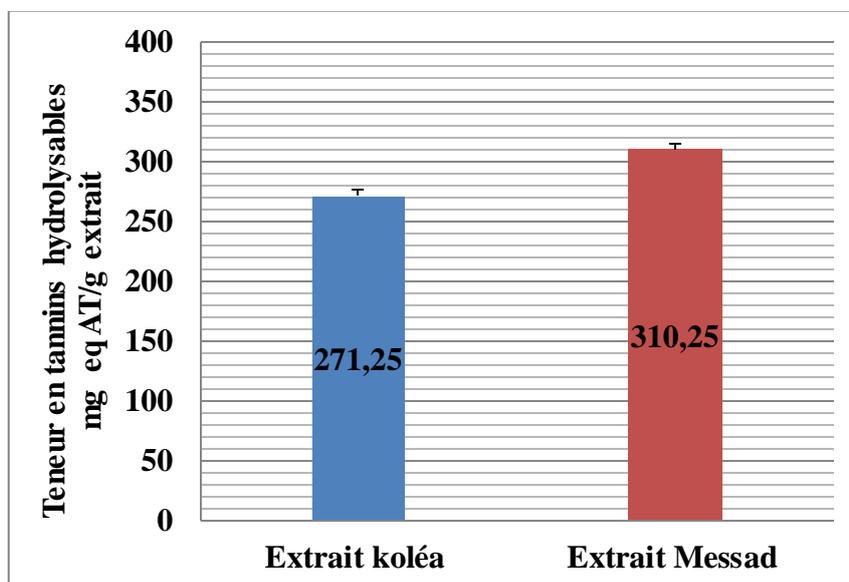


Figure n°37 : Teneur tanins hydrolysables des extraits méthaloniques de la peau de la grenade.

Tableau n°17 : Teneur en tannins hydrolysables des extraits méthanoliques de la grenade.

Espèces	Provenance	Teneur en tannins hydrolysable
<i>Punica granatum</i>	Koléa ⁽¹⁾	271,25±5,8
<i>Punica granatum</i>	Messad ⁽²⁾	310,25±4, 2
<i>Punica granatum</i>	Tunisie ⁽³⁾	421,6±54,8

(1) : Échantillon étudié Koléa ;

(2) : Échantillon étudié de Mesaad ;

(3) : (Saad H *et al.*, 2012).

Les résultats présentés dans le **tableau n° 17 et la figure n° 37** montrent que la proportion en tannins hydrolysables de l'extrait méthanolique des échantillons étudiés (**271,25±5,8_ 310,25±4 mg eq AT/g extrait**) pour la variété de Doux de koléa et Doux de Messad respectivement. Ces résultats sont inférieurs à celle donnée par (Saad H *et al.*, 2012) .

Le groupe de tannins hydrolysable est trouvé dans la peau (la cosse, l'écorce ou le péricarpe), les membranes et les moelles du fruit (Kulkarni *et al.*, 2004). Ce groupe contient les isomères de punicalagine, en plus de l'acide ellagique, l'acide gallagique, et punicaline, qui est responsable de 92% de l'activité antioxydante du fruit entier (Gil *et al.*, 2000).

Les tannins sont connus pour empêcher la peroxydation des lipides et les lipo-oxygénases *in vitro*, et l'information a été accumulée au cours de ces dernières années. démontrant leur capacité de piéger les radicaux tels que l'hydroxyle, le superoxide ,et le peroxyde ,qui sont connus pour être importants dans les états de pro-oxydation cellulaires (Gyamfi *et aniya*, 2002).

2.5. Évaluation de l'activité biologique des extraits de plantes étudiées :

2.5.1.Évaluation de l'activité antioxydante :

2.5.1.1. Activité de piégeage du radical DPPH :

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Soit l'habilité des extraits phénoliques à céder des protons hydrogènes, pour cela l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH est une méthode qui permet de mesurer cette activité antioxydante, ainsi selon (**Thaipong *et al.*, 2006 ; Siddhuraju, 2007**), cette méthode est largement utilisée pour sa fiabilité .

Le teste DPPH est un radical libre organique très stable de couleur violette foncée qui donne des maximum d'absorption autour de 515-528 nm. Selon nos conditions le maximum d'absorption pour notre analyse a été réalisé à 517 justifié par un balayage.

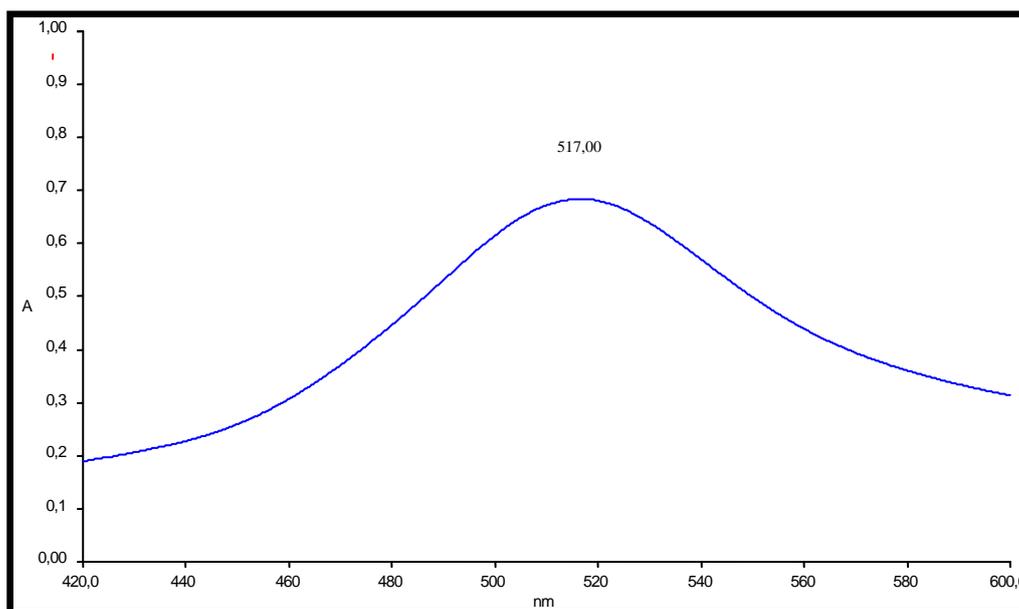


Figure n° 38 : balayage du DPPH.

Au cours de notre analyse, on a utilisé un antioxydant de synthèse qui est le BHT.

Les différentes teneurs de l'activité de piégeage du radical libre des deux extraits de la plante étudiées comparés à celles du BHT sont reportées dans le **tableau n°18** et illustrées sur la **figure n°39**

Tableau n°18 : Activité de piégeage du radical libre des extraits de *Punica granatum* comparée à celle du BHT.

Concentration (mg/l)	Activité de piégeage du radical libre DPPH ^a de l'extrait de <i>Punica granatum</i> (%)		
	<i>Extrait de Doux de koléa</i>	<i>Extrait Doux de Messad</i>	<i>BHT</i>
2	11,85±0,47	11,82±1,017	ND
5	23,43 ±1,17	21,91±2,77	ND
10	40,35±3,268	34,81±1,68	31,40±0,70
20	64,401±4,46	64,04±1,38	42,14±0,48
50	89,92±1,70	92,41±0,38	62,49±0,69
100	89,96±0,37	92,27±0,14	73,15±0,85

ND : valeur non déterminée : valeurs en moyenne ± écart-type.

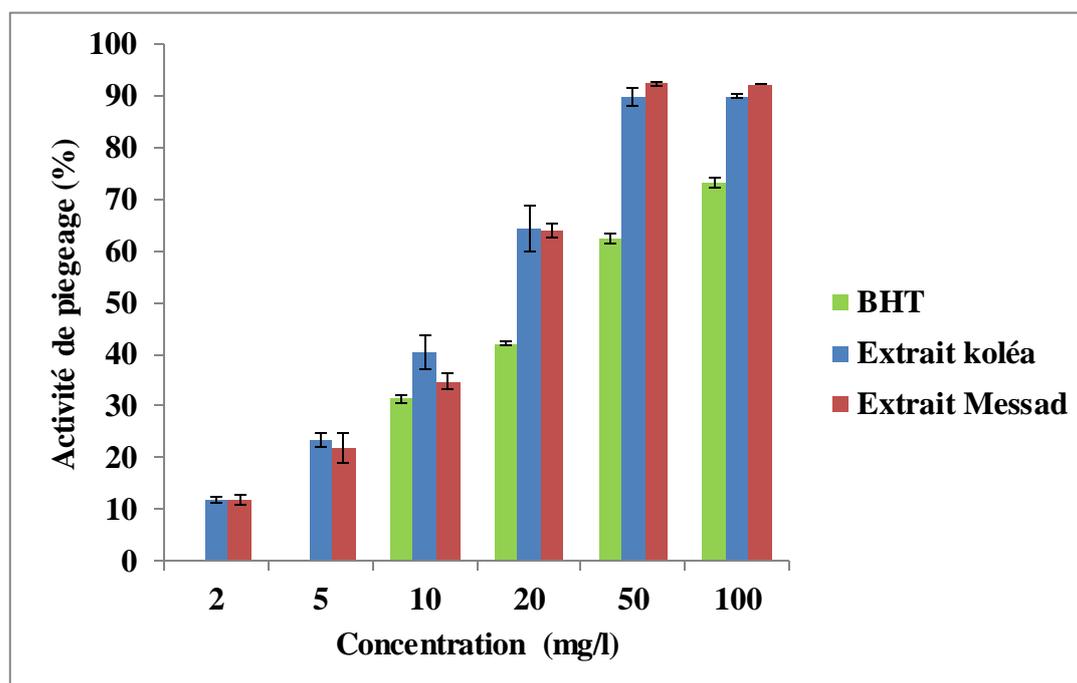


Figure n°39 : Activité de piégeage du radical libre par les extraits de Doux de Koléa et Doux de Messad et du BHT.

Il ressort de ces résultats que le pouvoir de piégeage du radical DPPH est très significativement dépendant de la concentration ($p < 0,0001$).

L'extrait de la peau de grenade montre une augmentation significative du pouvoir piégeage jusqu'à la concentration 50mg/l ($89,92 \pm 1,70\%$) pour l'extrait de Doux de koléa et ($92,41 \pm 0,38\%$) pour l'extrait de Doux de Messad ($P < 0,05$). puis au-delà une augmentation non significative est remarqué ($P > 0,05$).

Negi et jayaprakasha (2003) ont rapporté une forte augmentation de l'activité de piégeage des radicaux (DPPH) avec une augmentation de la concentration des extraits de peau de grenade jusqu'à 25 ppm après cela une légère augmentation de l'activité de piégeage des radicaux a été observé .

Les résultats du pouvoir piégeage du radical (DPPH) du doux de Koléa et le doux de Messaad suivi par celle du BHT ne présente pas une différence significatives ($P > 0,05$).

Aux concentrations supérieures ou égales à 10mg/l, l'activité de piégeage du radical libre de l'extrait méthalonique de Doux de koléa est plus importante que celle de Doux de Messad, et cela peut être attribué à sa forte teneur en composés phénoliques.

Nous constatons que les concentrations supérieures ou égales à 10mg/l montrent pour l'ensemble des extraits méthaloniques de l'écorce de la grenade locale, une activité plus élevée de celle du BHT.

Les pourcentages supérieurs à 90% peuvent être considérés comme une inhibition de l'absorption complète du DPPH, parce qu'après avoir terminé la réaction, la solution finale possède toujours une couleur jaunâtre et, par conséquent, l'inhibition de l'absorption à l'incolore ne peut atteindre à 100% par rapport à la solution de méthanol. L'absorption résiduelle permanente a comme conséquence jusqu'à 7% d'inhibition d'absorption totale (**Milliauska et al., 2004**).

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par **Zahin et al., (2010)** ont trouvé qu'à 80mg/l ,l'extraction des polyphénols de peau de la grenade a donné des capacité d'inhibition d'absorption de radical DPPH : 90.53%, 86.4% et 83.2% pour la fraction de méthanol, d'acétone et d'éthanol respectivement .

Dans une autre étude **Singh, Murthy et Jayaprakash (2002)** ont trouvé qu'à 50 ppm, les polyphénols extraits de la grenade par l'acétate d'éthyle, le méthanol, et l'eau montraient une activité de piégeage de radical libre DPPH de 46, 81 et de 43% respectivement.

La teneur élevée en composé phénolique contenue dans l'extrait de grenade peut expliquer sa forte activité antioxydante. Dans les investigations sur les activités antioxydantes de certains extraits de peau de fruit y compris la grenade et de la banane, montrent une activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée (**Okonogi et al., 2007**).

Selon **Rodriguez-Rojo et al., 2012**, l'activité antioxydante est en relation avec la méthode d'extraction et la nature du solvant utilisé.

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'antioxydant naturel inhibe mieux le radical DPPH que l'antioxydant synthétique BHT. Ceci est soutenu par les valeurs d'IC₅₀.

Une valeur plus faible d'IC₅₀ (définie comme la concentration du composé capable d'inhiber 50% de tous les radicaux de DPPH) indique une activité antioxydante plus élevée (**Zhang et al., 2010**).

Les concentrations inhibitrices IC₅₀ des différents antioxydants sont représentées dans la figure suivante :

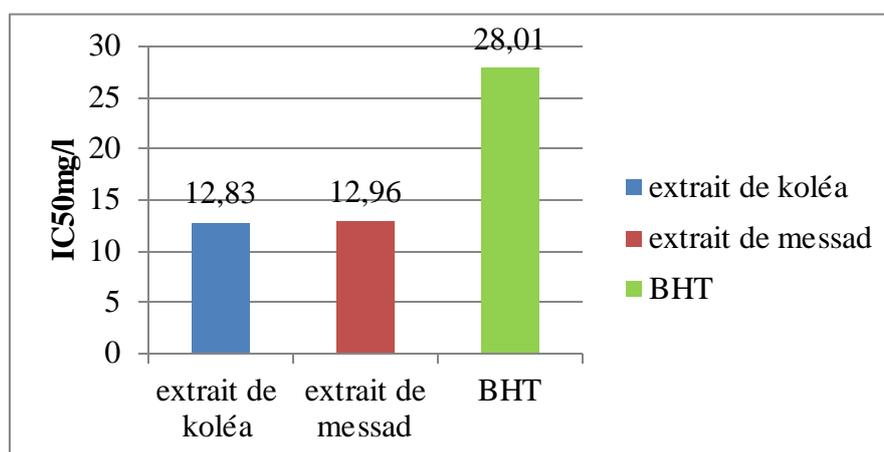


Figure n°40 : Concentrations pour 50% d'inhibition des radicaux libres, du BHT et des extraits méthanolique de *Punica granatum*.

L'extrait de Doux de koléa et Doux de Messad montre une IC₅₀ (12 ,83mg/l) et (12,96mg/l) plus faible que le BHT (28 ,01mg /l).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Kanatt *et al.*, (2010)** qui ont trouvé que l'IC₅₀ (de radical DPPH) du BHT était plus élevée que celle de l'extrait de la peau de grenade.

Des résultats similaires rapportés par **Okongi *et al.*, (2007)**, qui ont trouvés que parmi huit peau de fruit étudiées, la peau de grenade a eu le pouvoir de piégeage le plus élevé (IC₅₀ le plus faible).

Kulkarni *et al.*, (2004) rapportent une IC₅₀ de 8,33mg/l pour les extraits méthaloniques des écorces de la grenade. Cette forte activité antioxydante est liée à la forte concentration en composés phénoliques.

Ce phénomène est vérifié pour les extraits que nous avons étudiés, il est à noter que l'intensité du pouvoir de piégeage augmente avec la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de chaque extrait comme résumé dans le **tableau n°19**.

Tableau n°19 : Valeurs des IC₅₀, polyphénols totaux et flavonoïdes et des tanins hydrolysables différents extraits de la peau de la grenade :

Extraits	IC ₅₀ (mg/l)	Polyphénols totaux (mg.eq.AG /g d'extrait)	Flavonoïdes (mg.eq.Qr/g d'extrait)	Tanins hydrolysables (mg.eq.EAT/g d'extrait)
Extrait de koléa	9,966±1,15	495,83	22,67±0,75	271,25±5,8
Extrait de Messad	12,75±0,88	460,16	20,04±0,30	310,25±4, 2

La variabilité des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes déterminante du pouvoir de piégeage, est elle-même liée à la variabilité relative des écotypes dont les extraits sont issus (**YesilCeliktas *et al.*, 2007**). Cette variabilité en composition chimique des écotypes (et donc du pouvoir de piégeage du radical DPPH) est dépendante des facteurs génétiques et environnementaux (climat, altitude, latitude, etc...) dans lesquels évolue la plante (**Shan *et al.*, 2005 ; Wojdyło *et al.*, 2007**).

L'activité antioxydante des extraits de peau de grenade pourrait être attribué à la présence des polyphénols, comme les tanins ellagiques, l'acide ellagique et l'acide gallique (**Gil et al., 2000**).

La capacité des flavonoïdes ainsi que des phénols totaux à piéger les radicaux libres s'explique par leurs structures chimiques comportant un nombre important d'atomes d'hydrogène, des groupements hydroxylés, des noyaux phényles qui seraient capables de capter les radicaux libres en démobilisant leurs électrons célibataires (**Calliste et al., 2001, Torres de Pinedo et al., 2007 ; Wojdyło et al., 2007**).

Les résultats de test de piégeage du radical libre DPPH suggèrent que les composants qui se trouvent dans l'extrait sont capable de piéger les radicaux libres par l'intermédiaire de donation d'électrons ou d'hydrogène. Ceci montre également la capacité des extraits à piéger les différents radicaux libres dans les différents systèmes, ce qui indique qu'ils peuvent être des agents thérapeutiques utiles pour le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux (**Abdelazim et al., 2011**).

Ceci peut être bénéfiques dans la conservation des produits alimentaires, des formulations médicamenteuses et des produits cosmétiques, où les réactions en chaîne de radicaux libres ont comme conséquence l'oxydation des lipides et la détérioration ultérieures des produits (**Dastmalchi et al., 2008**) .

2.5.2. Pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur exprime la capacité à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}) et donc l'aptitude d'un extrait à s'interagir avec des composés chimiques réactifs en tant que donneur d'électrons de sorte que les radicaux libres deviennent plus stables lorsqu'ils sont réduits.

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des deux extraits de l'espèce étudié comparés au pouvoir réducteur du BHT, et exprimés par une absorbance à 700 nm sont représentés dans les **tableaux n°20** et la **figure n°41**.

Tableau n°20 : Pouvoir réducteur des extraits de *Punica granatum L* comparé à celui du BHT.

Concentration (mg/l)	Absorbance ^a des extraits de <i>Punica granatum</i> ue à 700 nm		
	Extrait de Koléa	Extrait de Messad	BHT
2	0,088±0,004	0,323±0,004	ND
5	0,117±0,01	0,357±0,021	ND
10	0,172±0,033	0,409±0,015	ND
20	0,465±0,012	0,533±0,042	0,311±0,006
50	0,901±0,085	0,933±0,041	0,576±0,001
100	1,434±0,162	1,409±0,056	0,863±0,011

ND : non déterminé ^a : valeurs en moyenne ± écart-type

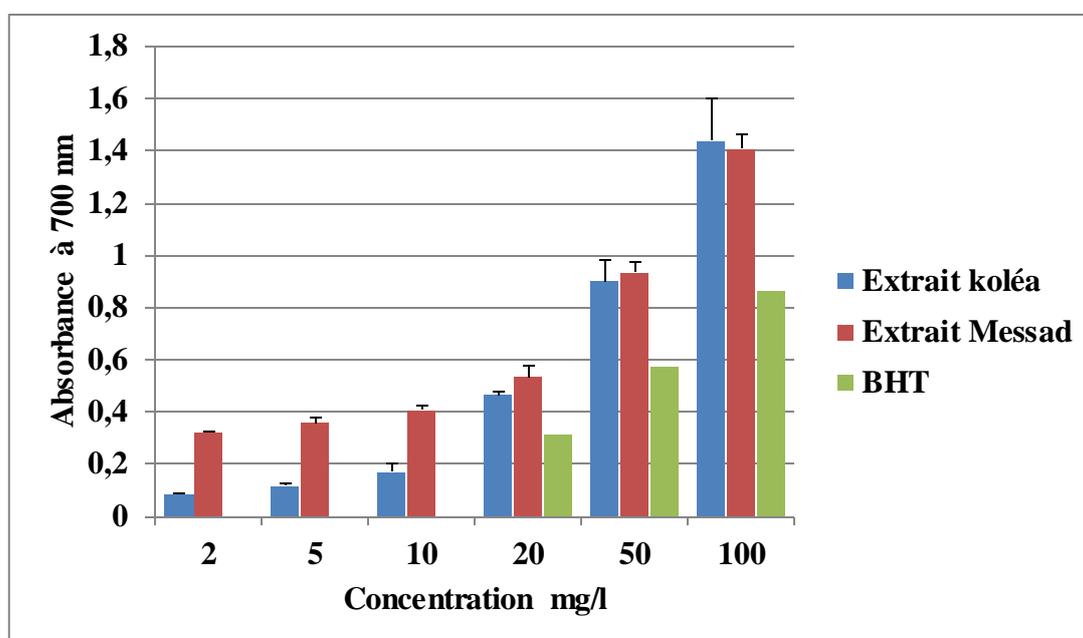


Figure n°41 : Pouvoir réducteur du BHT et des deux extraits méthanoliques de *Punica granatum* en fonction de la concentration.

D'après les résultats ci-dessus, tous les composés montrent un certain degré de pouvoir réducteur qui est supérieur à celui de BHT.

Aux concentrations (2, 5, 10 mg /l) l'extrait de Doux de Messad a un pouvoir réducteur plus élevé que l'extrait de Doux de koléa, au –delà de la concentration (20 mg /l) les deux extraits ont un pouvoir réducteur plus élevés que celui du BHT.

L'étude statistique de ces résultats montre une différence non significative ($P > 0,05$).

Negi et Jayaprakasha (2003) ont rapporté une augmentation significative de pouvoir réducteur de l'extrait de la peau de grenade avec l'augmentation de la concentration de 50 à 400 ppm.

Sachant que l'activité antioxydante (DPPH), le pouvoir réducteur de l'extrait augmente avec l'augmentation de la quantité de l'extrait.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Conclusion :

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place de choix en thérapeutique. En effet, les plantes médicinales constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

Le présent travail a porté sur l'étude des extraits méthanoliques (préparés à partir de la partie externe) du fruit de *Punica granatum L.*, et nous avons tenté de contribuer à sa valorisation en Algérie en établissant une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques.

✓ L'analyse de la composition en métabolites primaires de l'écorce de la grenade de la région de koléa et Messad montre une teneur en protéine de 0,55%

✓ La détermination de la teneur en sucre totaux est de 4,2% pour koléa supérieure à celui de Messad 3,4%.

✓ L'évaluation du taux de la matière grasse révèle une quantité de 0,95% majoritaire à celui de koléa 0,52%.

✓ La détermination de la teneur en humidité relève une richesse en eau pour l'écorce fraîche de la grenade estimée à 7,12% pour la variété Doux de Koléa plus faible que celle de Doux de Messad 7,28%.

Pour l'obtention de différents extraits, nous avons réalisé une extraction organique par une macération au méthanol.

Le rendement en extrait méthanoliques réalisé par la méthode de macération simple enregistre une teneur de 35,8% pour la variété de Doux de Messad supérieure à celui de Doux de Koléa 27,5%. Cela peut être attribué à la variété et les conditions édaphiques.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins, hydrolysables. Ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques

L'estimation quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés dans les deux extraits analysés montre que les écorces de la grenade étudiée sont riches en polyphénols 726,75mg/g de MS et 642,58mg/g de MS pour Doux de Messad et Doux de koléa respectivement.

Conclusion

Le dosage des tannins hydrolysables a révélé une dominance de ces derniers 310,25mg/g de MS pour la variété de Messad par rapport à celle de Koléa 271,25 mg/g de MS.

Le dosage des flavonoïdes a montré que la teneur est faible en ces derniers pour les deux variétés, Doux de koléa et Doux de messad (22,67 d'extraitmg/g de MS) et (20,04mg/g de MS) respectivement.

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par deux tests in vitro : L'inhibition du radical DPPH et le pouvoir réducteur.

- Le test de piégeage du radical DPPH a montré une forte capacité inhibitrice des extraits méthanoliques par rapport à celle du BHT. lie à sa forte teneur en polyphénols
- Aux concentrations utilisées (2,5, 10,20 mg/l) l'extrait de Doux de koléa possède une activité antiradicalaire forte légèrement à celle de Doux de Messad, et aux concentrations 50 et 100 mg/l l'extrait de Messad enregistre une activité supérieure à celle de Koléa.
- L'inhibition du radical DPPH exprimé en concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres (IC₅₀) indique d'une part que l'extrait de Doux de Koléa et Doux de Messad (IC₅₀=12,83 mg/l, IC₅₀=12,96 respectivement) faible en comparant à celle du BHT (IC₅₀=28,01mg/l). La peau de grenade a eu le pouvoir de piégeage le plus élevé (IC₅₀ le plus faible).
- L'activité antioxydante retrouvée dans les extraits de *Punica granatum L.* confère à la plante des vertus thérapeutiques.
- En ce qui concerne le pouvoir réducteur des deux extraits étudiés, nous constatons qu'aux différentes concentrations, l'extrait de Doux de Messad possède un pouvoir réducteur plus élevé que celui de Doux de Koléa suivi par celle du BHT.
- L'analyse qualitative par HPLC permet d'isoler pour la première fois a montré la catéchine et la quercétine dans les extraits de ces deux variétés nouvellement étudiées.

Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur les différentes parties du fruit (peau, pulpe et graines) en se focalisant sur les différents extraits organiques, à savoir le fractionnement.

Des extraits voir même isolement de substances qui sous entendent les diverses activités détectées. De plus, des études approfondies concernant

Conclusion

l'identification des composés par des méthodes plus performantes seront nécessaires.

Pour mieux évaluer l'activité antioxydante, d'autres études *in Vitro* et *in Vivo* seraient intéressantes, il serait souhaitable de faire une étude dans le domaine toxicologique afin de mettre à la disposition des populations une plante active avec des posologies précises.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Afaq F., Malik A., et al. 2005. - Pomegranate fruit extract modulates UV-B mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and photobiology*. N°81. Pages 38-45.

Alejandra Martínez-Ramírez, Juan Carlos Contreras-Esquivel y Ruth Belares-Cerda, 2010. extraction de polyphénols assistée par microondes à partir de *Punica granatum* L. *Revista Científica*, vol. 2, n°4.

Ali Tehranifar, Mehdi Zarei, Zahra Nemati, Behnam Esfandiari, Mohamad Reza Vazifeshenas., 2010. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, vol.126, p.p.180-185.

Amarowicz, R., Troszynska, A., Shahidi, F., 2005. Antioxidant activity of almond seed.

Amira Abdel Motaal*,a and Sherif Shaker., 2011. Antioxidant Activities of Standardized Whole Fruit, Pulp, and Peel Extracts of Egyptian Pomegranate. vol :66 ,p.p41-45.

Ángel Calín .Sánchez D. Ángel A. et Carbonell Barrachina 2010. la grenade cultivée en Espagne .édition Hernade.108p.

Ardestani A., Yazdanparast R., 2007. Antioxydant and free radical scavenging potential of Achilleasantolina extracts. *Food Chem*, vol.104, p.p.21-29.

Aruoma O.I., 1999. Free radicals, antioxidant and international nutrition. *Asia Pacific J Clin Nutrition*, vol.8, p.p.53-63.

ASHTON R., Baer B et Silverst D., 2006. The incredible pomegranate plant & fruit. Third Millennium Publishing.

Audigié C., Figarella J., Zonszain F., 1978. Manipulation d'analyse biochimique. Doin (Ed). Paris, 247.

BÄRTELS A., 1998. Guide des plantes du bassin méditerranéen. Editions Ulmer. 400 pages. Page 352.

Ben Amor B., 2008. Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principe actif ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC, Thèse de doctorat, Université de Rochelle ,Génie des procédés industriels 187p.

Références

Berset C .et al., 2006. Méthode dévaluation de degré d'oxydations des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Science des aliments*, n.16, p. p. 219-245.

Bonnier G., 1990. La grande flore, édition Belin, Paris ,676p .

Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Delattre J., 2003. Radicaux libres et anti-oxydants. In : *Biochimie pathologique : aspects moléculaires cellulaires. Médecine-sciences.* Flammarion (ed).Paris, p. p. 59-81.

Bossard R et Cuistante P., 1986. Arbres et arbustes d'ornement des région tempérée et méditerranéenne. *Techniques et documentation .Lavoisier, France ,600p.*

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 2eme edition Tec et Doc(Ed). Paris, 914p.

Buettner G., 1999. Singlet oxygen toxicity is cell line-dependant: a study of lipid peroxidation in nine-leukemia cell lines in photochem photobiol, n. 70, p.p. 858-67.

Bylka., Mathwska I.et Pilewski N.A., 2004. Natural flavonoid as antimicrobial agents. *Journal of the American Natraceutical Association*, vol.7, n.2,P.P.24-26.

Cam M . and Hisil Y., 2010. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegrenate peels. *Food Chemistry* 123 (2010) 878-885.

Cavin A., 1999. Investigation phytochimique de trios plantes Indonésiennes au propriétés antioxydantes et antiradicalaires : *Tinosporacispa* (Menispermacées), *Merremiaem arginata* (Convolvalacées) et *Oropeaenneanda* (Annonacées). Thèse de doctorat, Lausanne, 241 p.

Ciulei I., 1982. Methodology for analysis of vegetable drugs. *Parnaris* (Ed), Bucharest, 67p.

Cowan M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, vol.12, n.4, p.p.564-570.

Cristóbal Noé Aguilar¹, Antonio Aguilera-Carbo, Armando Robledo., 2008. Production of Antioxidant Nutraceuticals by Solid-State Cultures of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Leaves, *Food Technol. Biotechnol*, vol, 46, p.p.218-222.

Depeint F.,Gee J.M.,Williamson G,et Johson I.T.,2002. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceeding of the Nutrition Society*, vol. 61, n 3, p.p. 97-103.

Références

Diallo A., 2005. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygiumguineense* willd (Myrtaceae).Thèse de doctorat d'État en pharmacie, Mali, Université de Bamako,199p.

Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K., Maiza A., 2004. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R.Chimie*, 7:1073-1080.

Dixon N et Paiva., 1995.Stress induced phenylpropanoid metabolism in plant cell.

Dubois M.K.A., Gilli Y.K., Hamilton P.A., (1956). Colometrie method for determination of sugari et related substances, *Anal et chem.Jour.*, Vol. 28, pp. 350-356.

Erdman J., Balentine J.D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly., Hollman J.P., L-Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WILLIAMSON G et Burrowes J., 2007.Flavonoids and heart health :Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1,2005,Washington. *Journal of Nutrition*, vol.137,p.p.718-737.

Favier A., 2003.Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. Vol.15, p.p.108-115.

FERHAT., 2009. Recherche de substances bio actives de *centaurea microcarpa* coss et Université de M'sila - Diplôme étude supérieur de biochimie.

Fernandez-Gutierrez, A. (2006) .Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.

Ferriere I., barros L., Soares M.Bastos M.L., Pereira J.A., 2007. Antioxydant activity and phenolic contents of olèa europaea L.leaves sprayed with different copper Formulations. *Food chemistry*, 103,188_195.

Frankel E.N., Meyer. A.S., 2000.The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxydants, *Journal of Science and Food Agriculture* ,vol.80,p.p.1925-1941.

Références

Garnier G., Bezanger-Beauquesne L., et al., 1961. Ressources médicinales de la flore française. Editions Vigot Frères Tome II. 1511 pages. Pages 838-842.

Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, vol.3, n.4, p.p.162-169.

Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., H. Saad, F. Charrier-El Bouhtoury, A. Pizzi, K. Rode, B. Charrier, N. Ayed., 2012. Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products*, vol, 40, p. p. 239-246.

Halliwell B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity, cause, of consequence in *lancet*, n.344. p.p.721-724 .

Hemingway, R.W., 1992. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : *Plant polyphenols : synthesis, properties, significance*. Laks P.E, Hemingway R.W New York.

Henri G , 2009 . De la grenade et du grenadier . Equinoxe (Nature carrés), Saint Remy_de Provence 158p.

Hertog M.G. 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society.*, vol.55, n.1. p.p. 385-397.

Hsieh-Wilson L.C., Schultz P.G. et al., 1996. Insights into antibody catalysis : structure of an oxygenation catalyst at 1.9-angstrom resolution in *porc Nalt Acad Sci USA*, n.93, p.p.5363-5367.

Hultin H.O., 1994. Oxydation of lipids in sea foods chemistry, *Processing Technology and quality*. F. & Botta, J.R. (Eds), Blakie Academic & Professional New York, p.p.49-74.

Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungbult T.P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenbock G. et Schnizler J.P., 1998. Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy *Journal of experimental botany.*, vol, n.323, p.p. 953-965.

ISO 1842, NA 2233, 1993. Mesure du potentiel d'hydrogène (pH).

Jayaprakasha G.K., Selvi T., Sakariah .K.K (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res .Int.*, 36 :117_122.

Références

Julie Jurenka, MT,(2008).Therapeutic Applications of korpon.Z Anal. Chem., Vol. 22. Pp.366-382.

Jurenka J., 2008. Therapeutic Applications of Pomagrenate (Punica granatum L) :Areview Alternative Medicine Review Volume 13,Number 2,128_144.

Karaali A.,Boyacioalu D.,Gunez G.et Ozçelik B.,2004.Flavonoids in fruit and vegetebales :their impact on food quality,nutrition and health-Strep or CA.Europeancommision's the 6th framework programme for research.Istanbul technical University.Turkey,261p.

Kjeldhal J., (1883). Method lurk besyimmung des stichs offs in organischem.

Koechlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygène, stress oxydant et supplémentassions anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition clinique et métabolisme,vol.,20,p.p.165-177.

Koechlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygène, stress oxydant et supplémentations anti-oxydant aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition clinique et métabolisme, vol.20, p.p.165-177.

Lansky, E.P., Newman, R.A (2007). Punica granatum (pomagrenate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer .Journal of ethnopharmacology, 109, 177_ 206.

Laurent C et Oestveldt K., 2008. Impact des polyphénols de raisin sur des marqueurs physiologiques et biochimiques du vieillissement intestinal, Ed howest, 78 p.

Laurent., 1991.Éléments minéraux. In: Techniques d'analyses et du contrôle dans les industries agroalimentaires. Paris Volume 4, lavoisier, PP78_98.

Li Y., Guo C., Yang J., Wei J ., Xu J.and cheng S., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegrenate peel extract in comparison with pomegrenate pulp extract.Food Chem.vol96p.p 254_260.

Macheix J.J., Fleuriet Annie et al., 2005. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques, presses polytechniques et universitaires romandes,162p.

Références

Macheix J-J., Fleuriet A et Sarni – Machado P 2006. Composés phénoliques dans la plante -structure, biosynthèse répartition et rôles, In Sarni Machado P. et Cheynier V., les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier, 398 p.

Malesev D.et KunticV., 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoids complexing reactions. Journal of the Serbian chemical society. vol.c 72, n.10,p.p. 921-939.

MarianaW,Pan Z and Maa H., 2010.extraction modeling and activities of antioxydants from pomegrenate marc.Journal of food Engineering vol :99,p.p16_23.

Margot et Sphohn R., 2007. 350 arbres et arbustres édition Franckh_Kosmos verlage ,256p.

Mars M, Carraut, A., Marrakchi, M., Gouiaa, M. et Gaaliche, F., 1994. Ressourcesgénétiques fruitières en Tunisie (poirier, oranger, figuier, grenadier). Plant geneticResources Newslette.Vol :100.P_P1-4.

Medic-Saric M.,Jasprica I.,Smolcic-Bubalo A.et Monar A.,2004. Optimisationofchromatography of flavonoids and phenolic acids.CROATICA CHEMICA ACTA CCA.,vol. 77,n.1-2,p.p.361-366.

Menvielle-Bourg Joanny F., 2005. La superoxydedismutase, puissant antioxydant naturel, disponible par voie orale in Springer Phytothérapie.3, p.p.118-121.

Mohammedi Z., 2006.Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelque plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Tlemcen.

Narayana K.R., Reddy M.S.,Chaluvadi M.R.et Krishna D.R., 2001.Bioflavonoidsclassification,pharmacological,biochemical effects and therapeutic potential. Indianjournalofpharmacology, vol.33 p. p.2-16.

Naseem Ullah, Javid Ali, Farhat Ali Khan, 1Muhammad Khurram, Arshad Hussain., 2012. Proximate Composition, Minerals Content, Antibacterial and antifungal Activity evaluation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels Powder, Journal of Scientific Research, vol, 11, p.p.396-401.

Negi Jayaprashka et Jena., 2003. Antioxydant and antimicrobial activity of pomagrenate peel extract improves the shelf life of chicken products .Inter .J.of food and tech ; 45 P.p 216_222.

Références

Neve J., 2002. Antioxydants alimentaires : Vitamines, oligoéléments et non-nutriments in Aliments fonctionnelles. Tec & doc éd, paris, p.p. 281-313.

Nijveldt R .J., Van Nood E., Van Hoorn D.E .C.,Boelens P.G.,Van Norren K. et Van Leeuwen P.A.M.,2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. American journal of clinical nutrition, vol.74,p.p 418-425.

Oyaizu M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine .Journal of nutrition, Vol.44 .p.p 307 _315.

Paris R.et Moyses M.,1965. Précis de matière médicale. 4^{éd} .masson .Paris.412 p.

Pelli K et Lyly M., 2003. Les antioxydants dans l'alimentation in biotechnology Final,n.2,p.p.15-20.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydant Physiological action of antioxidant defences. Nutrition clinique et métabolisme,vol.16,p.p.233-239.

Planchon G., Collin E.,1875 .Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale. Librairie F. Savy. 1875. Tome I. Pages 235-236 et 307-308.

Ren W.,Qiao Z., Wang H.,Zhu L.,2003. Flavonoids :Promising anticancer agents. Medicinal research reviews.,vol.23,n.4,p.p. 519-539.

Rhodes et al., 1981. Association between métabolites of aromatiques compounds in bile and the occurrence of hepatic lesion in english sole (Parophrys vetulus) from Puget sound, washington in springerlink Archives of environmental Contamination and Toxicology.vol.15,n59,p.p 533-561.

Rolland Y., 2004. Antioxydants naturels des végétaux. Foodchemistry, vol. 11,p.p.1-6.

Sahin F., Gulluce M.,Daferera D., Sokmen A.,Sokmen M.,Polissiou M., Agar G.et Ozer H.,2004. Biological activities of the essential oils and méthanol extract of origanum vulgare ssp.vulgare in the eastern Anatolia of Turkey.Food control., vol 15.p.p .549 -557.

Salah A. Al-Maiman, Dilshad Ahmad.2002. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (Punica granatum L.) fruit maturation.Food Chemistry vol 76 p.p 437-441.

Références

Sarni Manchado P. et Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier,398 p.

Schonfelder et Ingrid 1988. Cahier d'histoire des techniques – Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'université de Provence. 1992. 174 pages. Page 81.

Singh R.P., Jayaprakasha G.k and Sakariah K.K (2001).A process for the extraction of antioxydants from pomagrenate peels.submitted for Indian patent No.392 /Del/01.

Spichiger R.-E., Savolainen V., et al. 2004. - Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Editions Presses polytechniques et universitaires romandes. Troisième édition. 413 pages.

Strover E .and Mercure E .W., 2007. The pomagrenate a new look at the fruit of paradise .Hort .Science 42 :1088_1092.

Sultana B.,Anwar F., Rafique Asi M.and Ali Shahid Chatha S., 2008.antioxydant potential of extracts from differents agro wastes :stabilization of corn oil.Grasas y aceites,593.

Therond P., Bonnefont-Rousselot D.,2005. Systèmes antioxyfdants endogènes in radicaux libres libres et stress oxydant :aspect bibliographique.3éd.paris,Tec& Doc,p.p.87-163.

Tiqwari A.K., 2001. Imbalance in antioxydant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxydants therapy. Current science, vol.81,n.9, p.p.1179-1181.

Urquiaga I.et Leighton F., 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological Research,vol .33,n,p.p.55-64.

Valko M., Rhodes C.J.b., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals,metalsand antioxydants in oxydative stress-induced cancer.chemico-Biological Interactions,vol.160,p.p.1-40.

Verhoeyen M.E., Bovy A.Collins G., Muir S.,Robinson S., De Vos C.H.R et Colliver S., 2002.Increasingantioxidantlevels in tomatoes through modification of theflavonoid biosynthesis pathway.Journal of experimental botany.,vol.53,n.377 ,p.p.209-210.

Wang M .L., Wang J.T., and Choong Y.M., 2004. A brapid and accurate methode for détermination of methanol in alcoholic beverage by direct injection

Références

cappilary gas chromatography. Journa lof FoodComposition and analysis, V17,p.p 187_196.

Wenjuan Qu, Zhongli Pan, Haile Ma,2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. Journal of Food Engineering,vol.99,p.p.16-23.

www.plantidentification.co.uk/fruits_legumes/liste/grenade/grenade.htm.

ANNEXE 1 : Matériels utilisés



Micropipettes



Balance analytique



Distillateur de protéines



Four à moufle



Spectrophotomètre UV-visible



Étuve de séchage



HPLC type shimadzou

Autre matériel :

- Appareil soxhlet
- Minéralisateur
- Matériel courant de laboratoire
- Bain marie
- Rotavapor type Buchi R200
- Agitateur.

ANNEXE 2 : COURBE D'ETALONNAGE :

La gamme d'étalonnage est effectuée de la façon suivante :

- Une solution mère de α D (+) glucose est préparée à une concentration de 1%. A partir de cette dernière, on prend 1ml et on complète le volume par l'eau distillée jusqu'à 100ml.
- Ensuite, on prépare des dilutions de différentes concentrations : 10, 25, 40, 60, 75 et 100 (μ g/ml).
- De chaque concentration, on prend 1ml au quel on ajoutera 1ml de phénol à 5% et 5ml d'acide sulfurique à 98%.
- On maintient les tubes dans une étuve pendant 5min à 105°C, ensuite on les laisse dans l'obscurité pendant 30min.

Annexe

- Enfin, on lit la densité optique, de chaque concentration, à 490nm et on trace la courbe d'étalonnage $DO = f(C)$.

Dont :

C : est la concentration en $\mu\text{g/ml}$

DO : est la densité optique.

ANNEXE 3 :

2. REACTIF C :

Mélanger FeCl_3 0.01M avec une solution d'HCl 0.001M (V/V).

3. CATALYSEUR :

Mélanger 20g de K_2SO_4 et 1g de HgO .

4. INDICATEUR DE TASHIRO :

10ml de méthyle rouge à 0.03% dans l'éthanol 70% et 1.5ml de bleu de méthylène à 0.1% aqueux.

ANNEXE 4 :

Extraction, caractérisation et dosage des composés phénoliques :

Tableau n°21 : Principales méthodes d'études des composés phénoliques.

	Techniques :	Principe :	Référence :
Extraction	Extraction par les solvants (macération)	Le contact entre le solvant (liquide) et la matière végétale (solide) a pour but de libérer les polyphénols présents dans les cellules par rupture du tissu végétal et par diffusion.	Owen et Johns, 1999 Hayouni et al., 2007
	Extraction par chromatographie sur colonne	Elle consiste à absorber sur une résine du type C18 pour les polyphénols et flavonoïdes des extraits végétaux puis à éluer sélectivement les substances polyphénoliques au moyen d'éthanol ou méthanol aqueux.	
	Extraction	-Le CO_2 supercritique, utilisé	Chan et Maznah

Annexe

	supercritiques (SFE)	<p>comme solvant d'extraction, du fait de sa faible viscosité lui confère une grande capacité de diffusion lui permettant d'avoir accès à des composés phénoliques liés à la paroi cellulaire et sa densité relativement élevée lui confère un pouvoir de solvation ce qui permet un meilleur taux d'extraction. -Procédé non dénaturant.</p> <p>-Temps d'extraction réduit.</p>	,2009
Séparation et purification	Chromatographie sur couche mince (CCM)	<p>Séparation et purification des différents constituants en fonction de leur taille et de leur forme Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire.</p>	Tissut, 1967
	Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	<p>L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les "grains" sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une</p>	CastanedaOvandoet al.,2009.

Annexe

		augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire	
	Chromatographie phase gaz (CPG)	Les différents solutés gazeux vont se séparer par migration différentielle le long de la phase stationnaire.	Colin-Henrion et al., 2008
Caractérisation	Chromatographie sur couche mince (CCM)	Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire.	Lawson,2006
	Spectrophotométrie UV-visible	méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de	Harbourne et al., 2009

Annexe

		Beer-Lambert. La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.	
	HPLC-MS et RMN		Bassomo et al.,2004
Dosage	Dosage par spectrophotométrie	Par méthode de Folin(non spécifique)	Harbourne et al.,2009
	Dosage par HPLC	Séparation sur colonne phase inverse C18 et détection à l'aide d'un spectrophotomètre UV 171	Lawson,2006

ANNEXE 5:

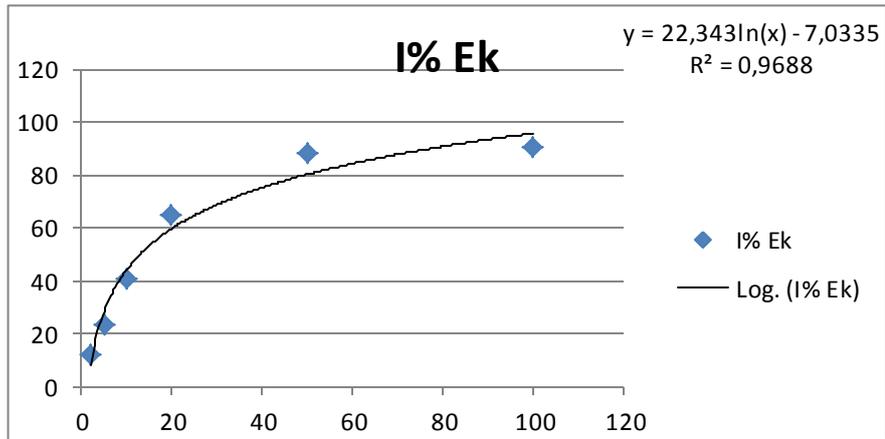


Figure n°42 : activité antioxydante de l'extrait de doux de Koléa

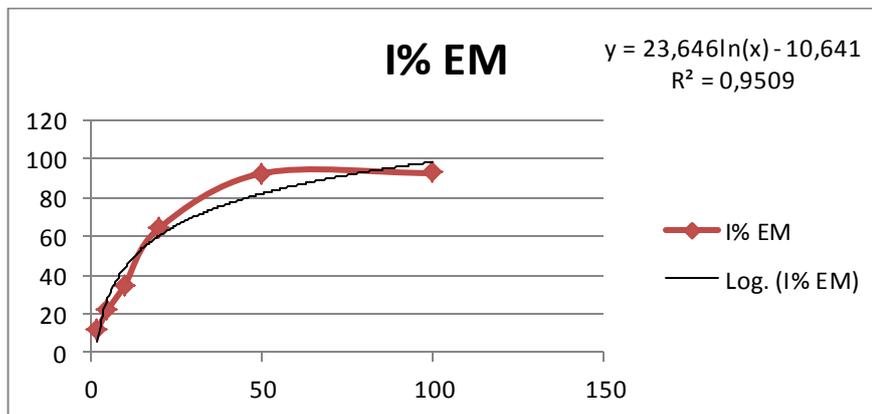


Figure n°43 : activité antioxydante de l'extrait de doux de Messad.

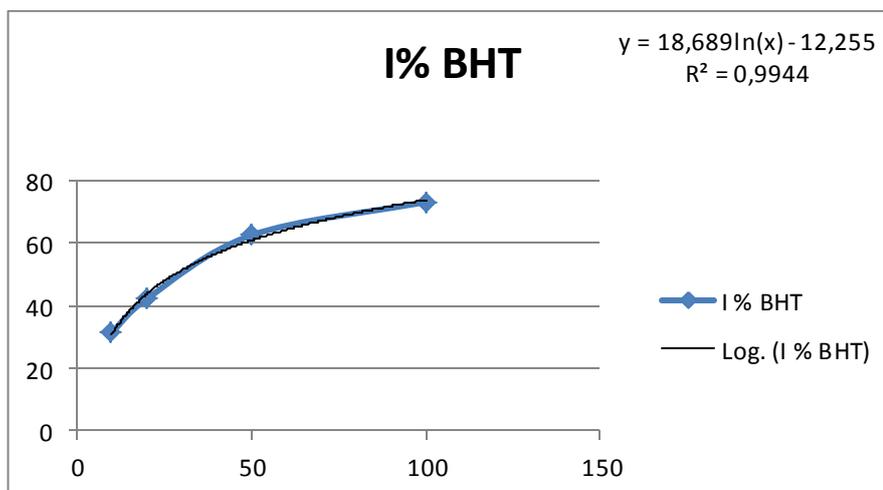


Figure n°44 : activité antioxydante

