



République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Echahid Hamma Lakhdar-El OUED
Faculté des sciences naturelles et de la vie
Département de Biologie cellulaire et moléculaire

Mémoire de FIN D'ÉTUDE

En vue de l'obtention du Master Académique

Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

**Contribution à l'étude de quelques activités biologique des
ècorces de grenade (*punica granatum*) du région d'oued-
Algeria**

Présenté par :

- ✓ **Zakia Sahraoui**
- ✓ **Imane Ba**

Devant le jury composé de :

Président : Dr Bouali Nourredine	M.C.B, Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued.
Examineur : Dr. Tlili Mohammed Laid	M.C.B, Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued
Promoteur : Dr Alia Fatma	M.C.A, Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued.

Année académique : 2023/2024.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Dieu merci de nous avoir donné la patience et la volonté de compléter cette note et de faciliter les moyens de réussir.

Nous remercions également Dr.Fatama Alia pour son approbation de superviser la préparation de notre mémorandum et d'exercer ses meilleurs efforts en matière d'orientation, de conseil et d'orientation, que Dieu lui accorde le succès dans sa carrière.

Nous remercions également les membres du comité Dr Bouali Nourredine , en tant que président, et Dr. Tlili Mohammed Laid en tant que examinatrice, pour nous avoir fourni de précieux conseils qui rendront le travail plus parfait.

Nous dédions également grâce au soutien et au compagnon de notre travail, Nawal Zamouli, que Dieu vous aide et vous place dans les plus hauts rangs.

Nous n'oublions pas non plus les membres du laboratoire qui ont donné toutes les conditions appropriées pour le succès du sujet du mémorandum, ainsi que tous ceux qui ont eu un coup de main, que ce soit de près ou de loin.



DÉDICACE

Louange à Dieu et merci à Dieu, qui m'a aidé, m'a aidé et m'a donné force et patience pour terminer mon mémoire. Je lui demande d'en faire une bénédiction, de m'en faire bénéficier et d'augmenter mes connaissances et. connaissance.

J'ai le plaisir de consacrer ce travail à : Mon premier soutien et soutien tout au long de mon parcours académique, à celui qui m'a allégé tout le fardeau, que Dieu le protège, prolonge sa vie, et lui accorde bonne santé et bien-être.

Mon cher père Abdelkrim

Vers qui était la source de sécurité d'où je tirais ma force. À celle qui m'a accompagné de ses prières dans mon parcours académique, à celle qui a été mon amie et ma sœur, que Dieu la protège et prolonge sa vie.

Chérie et âme, ma chère mère

À ceux dont la présence dans ma vie est la meilleure bénédiction que Dieu m'a accordée, la source de mon bonheur, de ma joie, de ma joie, de ma force, et du côté ferme qui ne penche pas, ô Dieu, accorde-leur le bonheur éternel et. accordez-les d'où on ne l'attend pas.

Mes frères Abdeljabbar, Abdelmadjid et Yahia

À ceux qui ont ajouté de la lumière à ma vie, et voyant que Dieu m'a fait le plus heureux de sa création, à ceux que je souhaite voir jouir d'une santé et d'un bien-être complets, ô Dieu, guéris-les avec un remède qui ne me fait pas mal. laisse derrière toi toute maladie, car il n'y a pas d'autre guérisseur que toi, et protège-les pour moi, ô Seigneur.

À ma chère sœur : Maria et à mon frère bien-aimé : Kacem

À celle avec qui j'ai partagé mes moments de joie et de tristesse. À celle avec qui j'ai partagé ce travail, oh mon Dieu, tu m'as donné la meilleure amie de ce monde, je te demande de ne pas me priver de sa compagnie. au paradis.

Mon ami : Ba imane



DÉDICACE

Avec l'aide de Dieu Tout-Puissant, Très Miséricordieux et Miséricordieux

je dédie ce travail

À celui qui m'a mis au premier plan, m'a élevé et m'a appris ce qui est juste. À mon cher père,
Ba Abdallah, décédé alors que j'étais à l'école.

Que Dieu lui fasse miséricorde

À celui qui m'a appris la résilience et l'espoir

L'être humain le plus grand et le plus gentil qui existe est ma chère mère, Salem Khadija, que
Dieu prolonge sa vie

À l'amour de mon cœur et à celui qui m'a soutenu tout au long de ma vie académique, ma
chère sœur Zohra

A celles qui m'ont soutenu, mes sœurs Rachida, Mbarakah Hayat et Gamra

A mes frères Ahmed, Mohammad Ali, Bachir, Saleh

A mon compagnon, mon cher époux, Mechri Boubakar

À ceux qui m'ont donné espoir et soutien. À la famille de mon mari.

A ma compagne et celle qui m'a accompagné tout au long de ma vie académique, ma chère
amie Sahraoui Zakia

À moi-même

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius	Na₂CO₃	Carbonate de sodium
%	pourcentage	nm	Nanomètre
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium	O₂•⁻	radical superoxide
APG	Angiosperms Phylogeny Group,	OH•	radical hydroxyl
BHT	Butyrylhydroxytulène.	PLT	Platelets Pourcentage%
CAT	catalase	RBC	Red Blood Cells
CI	Concentration inhibitrice	RO•	radical alkoxye
CRP	protéine C-réactive	ROO•	radical peroxye
DMSO	Dimethylsulfoxide	TCA	acide trichloracétique
DPPH	2, 2-diphenyl-1 picrylhydrazyl	tr/min	tour par minute
EAG	Equivalents d'acide gallique	UV-Vis	Ultraviolet-visible
FeCl₃, 6H₂O	solution de chlorure de fer	WBC	White Blood Cells
FNS	Numération formule sanguine	µg	Microgramme
FRAP	ferric reducing antioxydant power	µl	Microlitre
g	Gramme	ml	mililtre
GPx	glutathion peroxidase		
GRx	glutathion reductase		
H	Heure		
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène		
HCL	acide chlorhydrique		
HCl	Acide chlorhydrique.		
HGB	Hémoglobine		
IC₅₀	Concentration à 50 % d'Inhibition.		
K₃Fe	ferricyanure de potassium (CN) ₆		
Mg/ml	milligramme par millilitre		

Liste des figures

Figure 1. Arbre du Punica granatum (Willemse,2023)	6
Figure 2. Quelques cultivars de grenade (Oukabli, 2004).....	8
Figure 3. Écorce du Punica granatum (Zatoun & Ghanem, 2017).....	9
Figure 4. Les grandes familles de composés phénoliques (Fessard, 2017).	
Figure 5. Maladies traitées par P.granatum (Seeram et al., 2006).	11
Figure 6. Stress oxydatif et ses conséquences (Nagar et al., 2017).....	15
Figure 7. Migration des leucocytes des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire. (Douaouri, 2018).	22
Figure 8. Ètape de Anti-inflammatoire aigue (patrice,2014).....	23
Figure 9. Obtention d'une granulométrie moyenne à partir de l'écorce de grenade séchée	
Figure 10. Les souris utilisé dans étude in vivo.....	29
Figure 11. Étapes obtenu extrait des ècores de grenade	
Figure 12. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.	
Figure 13. Réaction du Chlorure d'aluminium et les Flavonoïdes (Ribéreau-Gayon, 1968).	
Figure 14. Courbe d'étalonnage de quercitine pour le dosage des flavonoids	
Figure 15. Courbe d'étalonnage de Catéchine pour le dosage des tanins condensés	35
Figure 16. Transformation du radical DPPH• en DPPHH (Moon & Shibamoto, 2009).	35
figure 17. Courbe des pourcentages d'inhibition du DPPH• pour l'acide ascorbique	36
Figure 18. Courbe d'acide ascorbique utilisée pour déterminer la valeur EC0.5 dans le test FRAP.	37
Figure 19. milieu de culture bactérie	
Figure 20. Remplissez les cavités résultantes avec des solutions aqueuses d'extrait d'écorce de grenade.....	40
Figure 21. Principe de la méthode de diffusion en milieu gélosé (Reguieg., 2019)	41
Figure 22. protocole de etude anti- inflamamtoire sur les souris in vivo	
Figure 23. Résultats des IC50 du radical DPPH de l'extrait de plante et de l'acide ascorbique.	49
Figure 24. Résultats des EC0.5 du test FRAP de l'extrait de plante et de l'acide ascorbique...	50
Figure 25. Résultats des AAR (%) du β carotène de l'extrait de plante et de BHT	50
Figure 26. Zones d'inhibition de l'extrait aqueux d'écorces de grenade chez les bactéries	
Figure 27. Effet de la caragénine sur la cuisse des souris	

Liste des tableaux

Tableau 1 : classification En 2009 APGII du grenadier.....	07
Tableau 2 Propriétés pharmacologiques.....	11
Tableau 3 Quelques tests d'antioxydants in vitro.....	18
Tableau 4: les souches des microorganismes utilise à l'étude d'activité antimicrobienne in vitro.....	28
Tableau 5 : Les produits chimiques utilise dans étude in vitro et in vivo.....	30
Tableau 6: Teneur en composés phénoliques de l'extrait des écorces de grenade.....	48
Tableau 7: Activité antioxydant de l'extrait aqueux des écores des grenade.....	51
Tableau8: Résultats de tests antimicrobienne.....	53
Tableau9: Effet du extrait aqueux des écores de grenade sur volume l'œdème induit chez les rats par l'injection de la caragénine.	55
Tableau10: Effet du extrait aqueux des écores de grenade sur pourcentage d'inhibition (%) de l'œdème induit chez les rats par l'injection de la caragénine.....	58
Tableau11: Résultats des analyses chimique de sang.....	60

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Abstract	
الملخص	
Introduction	
Partie bibliographique	
<u>Chapiter 1</u>	
Ècores de grenade	
1. Historique de la grenade	5
2.La grenade (<i>Punica granatum</i> L.)	5
3.Oringe	6
4.Nomenclature	6
5.Classification	7
6.Quelques cultivars de grenade	7
7. Écorce de grenade.....	8
8. Métabolites secondaires des plantes	9
9.Utilisations de la grenade	10
9.1.Utilisations industrielles	10
9.1.1.Teintures naturelles	10
9.1.2. Tannage et la teinture des cuirs	10
9.2.Utilisation médicinale.....	11
9.3.Utilisation dans les produits cosmétiques.....	11
9.3.Autres utilisations.....	11
11.Maladies traitées par <i>P. granatum</i>	11
<u>Chapiter 02</u>	

Les activités biologiques	
I. Activité antioxydante	14
I.1. Stress oxydantle	14
I.2. Radical libre	15
I.3. Antioxydants	16
I .3.1. Classification des antioxydants.....	17
3.1.1. Antioxydant enzymatique.....	17
I.3.2. Mécanismes d'action des antioxydants	17
I.3.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	18
II.Activité antimicrobienne.....	19
II.1. Antibiotiques.....	19
II.2.Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne	20
II.2.1.Méthode de dilution en milieu gélosé	20
II.2.2.Méthode de dilution en milieu liquide	20
II.2.3 Méthode E-test	20
III. Activités anti-inflammatoires	20
III.1.Inflammation	20
III.2.Types d'inflammation.....	21
III.2.1.Inflammation chronique	21
III.2.2.Inflammation aigue.....	21
III.3.Cellules et médiateurs de l'Inflammation.....	23
III.3.1.Cellules de l'inflammation	23
III.3.2. Médiateurs de l'inflammation	24
III.3.3. Anti-inflammatoires.....	24
III.3.3.1.Définition.....	25
III.3.3.2. Types d'anti-inflammatoires.....	25
Partie expérimentale	
<u>Chapiter 1</u>	
Matériel et méthodes	
1. Matériel.....	28

1.1. Matériel biologique	28
1.1.1. Matériel végétal	28
1.1.2. Matériel animal	28
1.1.3. Matériel d'activité antimicrobienne.....	29
1.2. Les Produits chimiques.....	30
2. Méthodes	31
In vitro	31
2.1. Préparation l'extrait des écores de grenade	31
2.2. Rendement d'extraction	31
3. Dosagesdes composé phénolique	31
3.1 Dosage polyphénol total	31
3.1.1. Principe.....	31
3.1.2. Mode opératoire	32
3.2. Dosage de flavonoïdes total.....	33
3.2.1. Principe	33
3.2.2. Mode opératoire	33
3.3. Dosage des tanins condensés.....	34
3.3.1. Principe.....	34
3.3.2. Mode opératoire.....	34
4.Activité antioxydante	35
4.1. DPPH.....	35
4.1.1. Principe.....	35
4.1.2. Mode opératoire.....	36
4.2. FRAP	36
4.2.1. Principe.....	36
4.2.2. Mode opératoire.....	37
4.3.β-carotène	38
4.3.1. Principe.....	38
4.3.2 Mode opératoire.....	38
5.Activité antimicrobienne	38

5.1. Méthode de diffusion sur gélose (méthode par puits)	38
5.2. Préparation du milieu de culture.....	39
5.3. Stérilisation du matériel.....	39
5.4. Préparation des dilutions d'extraits des plantes	39
5.5. Dilution de l'extrait d'écorce de grenade	39
5.6. Ensemencement et dépôt des disques	39
5.7. Lecture	40
<i>In vivo</i>	41
1. Tests anti-inflammatoires sur les souris	41
2. Toxicité.....	44
2. Méthode de sacrifice	44
3. Méthode de prélèvements sanguins.....	44
4. Étude statistique.....	45
<u>Chapiter 2</u>	
Résultats et discussion	
<i>In vitro</i>	47
1. Détermination du rendement	47
2.Teneurs des composés phénoliques.....	47
3. Activité antioxydante.....	48
3.Activité antimicrobienne	52
<i>In vivo</i>	54
Conclusion	
Références bibliographiques	



Résumé

La présente étude contribue à la valorisation d'une plante médicinale appartenant à la famille des Lythraceae (*Punica granatum*). Le grenadier possède une vaste histoire ethnomédicale et représente un réservoir phytochimique de valeur médicinale heuristique. C'est dans ce but que nous nous sommes intéressés à la valorisation des écorces de cette plante et à l'évaluation de ses propriétés phytochimiques et biologiques, à savoir : antioxydantes, antimicrobiennes ainsi qu'anti-inflammatoires. Le criblage phytochimique des extraits a permis de mettre en évidence la présence des principaux métabolites secondaires. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des tanins condensés. L'extrait aqueux préparé par macération démontre un contenu riche en composés polyphénoliques estimés à ($40,422 \pm 0,042$ mg EAG/g Ex), ($8,207 \pm 0,29$ mg EQ/g Ex) et ($6,892 \pm 0,291$ mg EC/g Ex) pour polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés respectivement. Une considérable activité antioxydante des extraits aqueux a été révélée par l'utilisation de trois méthodes ; le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer ferrique et le blanchiment du β -carotène. Une forte capacité d'inhibition contre les radicaux libres estimée par ($IC_{50} = 0,031 \pm 0,001$ mg/mL) par rapport au FRAP, qui donnait une capacité d'inhibition inférieure ($EC_{50} = 0,977 \pm 0,007$ mg/ml), tandis que le test β carotène préservait la couleur de l'extrait avec un excellent pourcentage ($91,495 \pm 0,07$ %). L'activité antimicrobienne de l'extrait d'écorces de grenade, par étalement des disques en milieu gélosé, a conduit à des zones d'inhibition variant de 7 à 13 mm contre *P. aeruginosae*, *S. aureus* et *B. subtilis*. Une étude de toxicité in vivo chez la souris a montré que l'extrait n'a pas des effets toxiques jusqu'à une concentration de 200 mg/L. L'application d'extrait aqueux des écorces de grenade comme anti-inflammatoire a montré une inhibition hautement significative de l'œdème des pattes des souris, d'une manière dose dépendante après 6 h de l'injection de la carraghénine. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de certains paramètres biochimiques, notamment le FNS et le CRP. En conclusion, la présente étude révèle une preuve biologique qui soutient l'utilisation de l'écorce du fruit du grenadier comme antioxydant, antiinflammatoire.

Mots clés : *Punica granatum*, Écorces, Composés phénoliques. Antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires.

Abstract

This study contributes to the valorization of a medicinal plant belonging to the Lythraceae family (*Punica granatum*). The pomegranate has a rich ethnomedical history and is a phytochemical reservoir with heuristic medicinal value. For this reason, we have been interested in valuing this plant's peels and evaluating its phytochemical and biological properties, namely antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory. The phytochemical screening of the extracts revealed the presence of the main secondary metabolites. This was confirmed by a quantitative analysis based on the dosage of total polyphenols, flavonoids, and condensed tannins. The aqueous extract prepared by maceration procedure demonstrates a high content of polyphenolic compounds estimated at (40.422 ± 0.042 mg EAG/g Ex), ($8,207 \pm 0.29$ mg EQ/g EX), and ($6,892 \pm 0,291$ mg EC/g Ex) for total polyphenols, flavonoids, and condensed tannins, respectively. A considerable antioxidant activity of aqueous extracts has been revealed through the use of three methods: the trap of the free radical DPPH, the reduction of ferric iron and the bleaching of β -carotene. A high free radical inhibition capacity was estimated by $IC_{50} = 0.031 \pm 0.001$ mg/mL compared to FRAP, which gave a lower inhibitory capacity ($EC_{50} = 0.977 \pm 0.07$ mg/ml), while the β -carotene test preserved the color of the extract with an excellent percentage ($91.495 \pm 0.07\%$). By extending the discs in an agar medium, pomegranate peels extract's antimicrobial activity resulted in areas of inhibition ranging from 7 to 13 mm against *P. aeruginosae*, *S. aureus*, and *B. subtilis*. An in vivo toxicity study in mice showed that the extract has no toxic effects up to a concentration of 200 mg/L. Application of aqueous pomegranate peels extract as an anti-inflammatory has shown a highly significant inhibition of mouse leg edema in a dose-dependent manner after 6 h of carrageenin injection. These results were confirmed by the study of certain biochemical parameters, including FNS and CRP. In conclusion, this study reveals biological evidence that supports the use of pomegranate fruit bark as an antioxidant and anti-inflammatory.

Keywords: *Punica granatum*, Peels, Phenolic compounds, Antioxidants, Antimicrobials, Anti-inflammatory agents.

الملخص

تساهم هذه الدراسة في تثمين نبات طبي ينتمي إلى عائلة الرمانيات (*Punica granatum*). يتمتع الرمان بتاريخ طبي عريق غني وهو مستودع كيميائي نباتي ذو قيمة طبية مشجعة. ولهذا السبب اهتمنا بتقييم قشور هذا النبات وتقييم خصائصه الكيميائية النباتية والبيولوجية، وهي مضادات الأكسدة، ومضادات الميكروبات، ومضادات الالتهاب. أظهر الفحص الكيميائي النباتي للمستخلصات وجود المستقلبات الثانوية الرئيسية. تم تأكيد ذلك من خلال التحليل الكمي بناءً على جرعة إجمالي البوليفينول والفلافونويد والعفص المكثف. يوضح المستخلص المائي المحضر بطريقة النقع محتوى عالي من المركبات البوليفينولية المقدرة بـ (0.042 ± 40.422 مجم EAG/g Ex)، ($0.29 \pm 8,207$ مجم EQ/g EX)، و ($0.291 \pm 6,892$ مجم EC/g Ex) مجموع البوليفينول، الفلافونويد، والعفص المكثف، على التوالي. تم الكشف عن نشاط كبير مضاد للأكسدة في المستخلصات المائية من خلال استخدام ثلاث طرق: إزالة الجذور الحرة DPPH، أرجاع الحديد، وتبييض البيتا كاروتين. تم تقدير قدرة تثبيط الجذور الحرة العالية بواسطة $IC_{50} = 0.031 \pm 0.001$ ملغم/مل مقارنة بـ FRAP، مما أعطى قدرة تثبيطية أقل ($EC_{50} = 0.977 \pm 0.07$ ملغم/مل)، في حين حافظ المستخلص على لون البيتا كاروتين بنسبة ممتازة ($91.495 \pm 0.07\%$). من خلال تمديد الأقراص في وسط أجار، أدى النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص قشور الرمان إلى مناطق تثبيط تتراوح من 7 إلى 13 ملم ضد *P. aeruginosa*، *S. aureus*، و *B. subtilis*. أظهرت دراسة سمية على الجسم الحي على الفئران أن المستخلص ليس له أي آثار سامة حتى تركيز 200 ملغم/لتر. أظهر تطبيق مستخلص قشور الرمان المائي كمضاد للالتهابات تثبيط كبير للغاية لوزمة ساق الفأر بطريقة تعتمد على الجرعة بعد 6 ساعات من حقن الكاراجينين. تم تأكيد هذه النتائج من خلال دراسة بعض المعايير البيوكيميائية، بما في ذلك FNS و CRP. وفي الختام، تكشف هذه الدراسة عن أدلة بيولوجية تدعم استخدام لحاء فاكهة الرمان كمضاد للأكسدة ومضاد للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum*؛ القشور، المركبات الفينولية، مضادات الأكسدة،

مضادات الميكروبات، مضادات الالتهاب.



Introduction

La nature est une source très riche de ressources végétales qui se caractérisent par une nature thérapeutique et depuis des milliers d'années, l'homme utilise ces plantes pour traiter tous les types de maladies. Environ 65 à 80 % de la population mondiale utilise la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins en soins de santé primaires en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne **(Ma et al., 1997)**.

La plante a été considérée comme contenant des ingrédients biologiquement actifs **(Shiban et al., 2012)**. En tant que polyphénols, flavanoïdes, tanins et propriétés antiseptiques, les médicaments à base de plantes sont utilisés à ce jour comme principale source de traitement médical **(Greenwell & Rahman., 2015)**.

La grenade est l'un des arbres d'occasion les plus populaires en médecine alternative pour son histoire médicale étendue et ancienne **(Padmaja & Prasad., 2011)**. Son fruit (grenade) est la partie la plus utilisée contenant des composants tels que les fibres biologiquement actives, les caroténoïdes, les composés phénoliques et les vitamines, en plus de ses graines, de son écorce, de son jus et de ses écorces **(Edeas, 2010)**. Par conséquent, la grenade est devenue l'objet d'un regain d'intérêt, que ce soit au niveau médical, pharmaceutique ou cosmétique **(Wald.2009)**.

Bien que les écorces de grenade soient considérées comme des déchets, elles contiennent des ingrédients biologiquement plus actifs que les fruits comestibles **(Akhtar et al., 2015 ; Rahmani et al., 2017)**. Ces ingrédients ont de fortes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et de nombreuses autres maladies telles que les ulcères infectieux.

Les écorces de grenade sont un domaine de recherche scientifique prometteur, dans le but de découvrir davantage de leurs propriétés thérapeutiques et de développer de nouveaux médicaments.

Cette note vise à étudier la contribution des écorces de grenade à l'activité des antioxydants, des antimicrobiens et des anti-inflammatoires. Et il cherche à répondre à la question suivante : l'extrait d'écorces de grenade affecte-t-il l'anti-oxydation, les bactéries et l'inflammation ?

Ce mémoire est structuré en deux parties, chaque partie étant divisée en deux chapitres:

★ **La première partie** débute par une synthèse bibliographique. Le premier chapitre de cette partie met l'accent général sur les écorces de grenade. Dans un deuxième chapitre, nous abordons général sur certaines activités biologiques.

★ **La deuxième partie** de ce mémoire présente notre contribution expérimentale à l'estimation de teneur quantitative de certains composés phénoliques et à l'étude de leurs activités

biologiques. C'était lors de son premier semestre, le chapitre des matériels et méthodes. Le deuxième chapitre de cette partie s'est concentré sur l'analyse et la discussion des résultats obtenus. Enfin, nous avons conclu notre mémoire par une conclusion générale qui comprend la réponse au problème soulevé ci-dessus et quelques suggestions possibles pour des études futures.

Partie bibliographique

Chapiter 1

Ècores de grenade

1. Historique de la grenade

Depuis des millénaires, la grenade et ses multiples déclinaisons (graines, écorces, fleurs, jus) font partie de l'alimentation humaine (Smith.,2014). Des traces de son utilisation se retrouvent dans les textes anciens grecs, égyptiens, bibliques et coraniques, ainsi que dans les traditions populaires de nombreux pays. (Chahnez.,2013).

La grenade figure parmi les plus anciens fruits comestibles connus. Son apparence n'a que peu changé depuis l'apparition de l'agriculture il y a plus de 1000 ans (Seeram et al., 2006 ; Çam et al., 2009). Appréciée des caravaniers et des navigateurs, sa pulpe gorgée d'eau et légèrement acidulée permettait d'étancher la soif lors des longues traverses (Vanier., 2005).

Symbole puissant, la grenade revêt de nombreuses significations : la vie, la fertilité, la longévité, l'immortalité et la divinité (Amjad.,2005 ; Lansky &Newman, 2007). Sa forme ronde et ses nombreuses graines symbolisent la prospérité et l'abondance (Ruis, 2015).

2.La grenade (*Punica granatum* L.)

Est un fruit cultivé par l'homme depuis l'Antiquité. Elle appartient à la famille des Punicaceae et pousse dans les régions tropicales et subtropicales. Son nom dérive du latin "Malum granatum" qui signifie "pomme granuleuse" (El Barnossi et al., 2021). L'arbre possède un tronc tortueux et épineux, des feuilles allongées vertes à la surface lisse et des pétales de couleur orange ou cramoisie. Il s'adapte très bien à des conditions climatiques variables. Le fruit est globuleux et mesure de 6 à 12 cm de diamètre. La coloration de la peau de la grenade varie du jaune, vert et rose, pouvant aller jusqu'au rouge intense et au violet foncé (Holland et al., 2009). Selon (Fawole & Opara 2013), la partie comestible représente 50% du poids total, les 50% restants correspondant à la peau. À son tour, la partie comestible est composée de jus (78% poids/poids) et de graines (22% poids/poids).



Figure 1.Arbre du Punica granatum (Willemse,2023)

3.Oringe

Originnaire d'Iran et d'Afghanistan, le grenadier y pousse spontanément depuis plus de 4000 ans. Son histoire est riche et remonte à l'Antiquité, comme en témoignent les représentations sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 avant J.C. et sa présence dans le jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant J.C (Camouretti & Comet, 1992).

Les principaux pays producteurs de grenades se situent en Orient : Iran, Turquie, Transcaucasie et Inde. La zone méditerranéenne est également un important producteur avec : Tunisie, Maroc, Espagne, Italie et Grèce (robert e. smith, ph.d.,2014).

La Californie aux Etats-Unis se distingue par une culture de grenade très développée. La production mondiale de grenade connaît une nette augmentation ces dernières années (Wald.,2009).

4.Nomenclature

Selon Hmid (2013), la nomenclature de Grenadier est :

- **Nom scientifique :** *Punica granatum*
- **Nom commun :** Grenadier

5. Classification

La position du grenadier dans la classification APGIII est la suivante:

Tableau1 : classification En 2009 APGII du grenadier

Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Rosidées
Ordre	Myrtales
Famille	Lythraceae
Genre	Punica
Espèce	<i>Punica granatum</i>

(Wald,2009)

6. Quelques cultivars de grenade

- **Gordo de Jativa:** Origine espagnole, maturité fin septembre, fruit moyen à gros (325 g), jaune orange, peau fine (2 mm), graines tendres, roses, sucrées (°Brix 14, acidité 0,32 g/100 g jus) (**Oukabli, 2004**).

- **Bedana (Inde):** Fruit moyen à grand, écorce marron, graines grenat ou rose clair, sucrées, pépins tendres (**Morton, 1987**).

- **Kandhari (Inde):** Fruit large, rouge foncé, graines d'un rose intense ou rouge sang, un peu acidulé, pépins durs.

- **Zhéri (Tunisie):** Deux clones: Zhéri précoce et Zhéri tardif, maturité fin septembre - mi-octobre, fruit jaune-orange, calibre moyen (300-350 g), graines tendres, roses (précoce) ou blanches (tardif), juteuses et sucrées (**Oukabli, 2004**).

- **Sefri (Tunisie):** Floraison début mai, maturité début octobre, fruit gros calibre (500 g), jaune, pulpe épaisse (6 mm), graines rose-clair, demi-tendres, juteuses et très sucrées (°Brix 14, acidité 0,24 g/100g jus (**Oukabli, 2004**).

- **Djeibi (Tunisie):** Floraison début mai, maturité mi-octobre, fruit moyen à gros (350 g), jaunâtre, graines demi-tendres, rose-claires et très sucrées (°Brix 16, acidité 0,2 g/100 g jus) (**Oukabli, 2004**).

• Autres variétés (Stover et Mercure, 2007) :

- Ahmar, Aswad, Holwa (Irak).

Loufani, Ras el Baghl (Palestine).

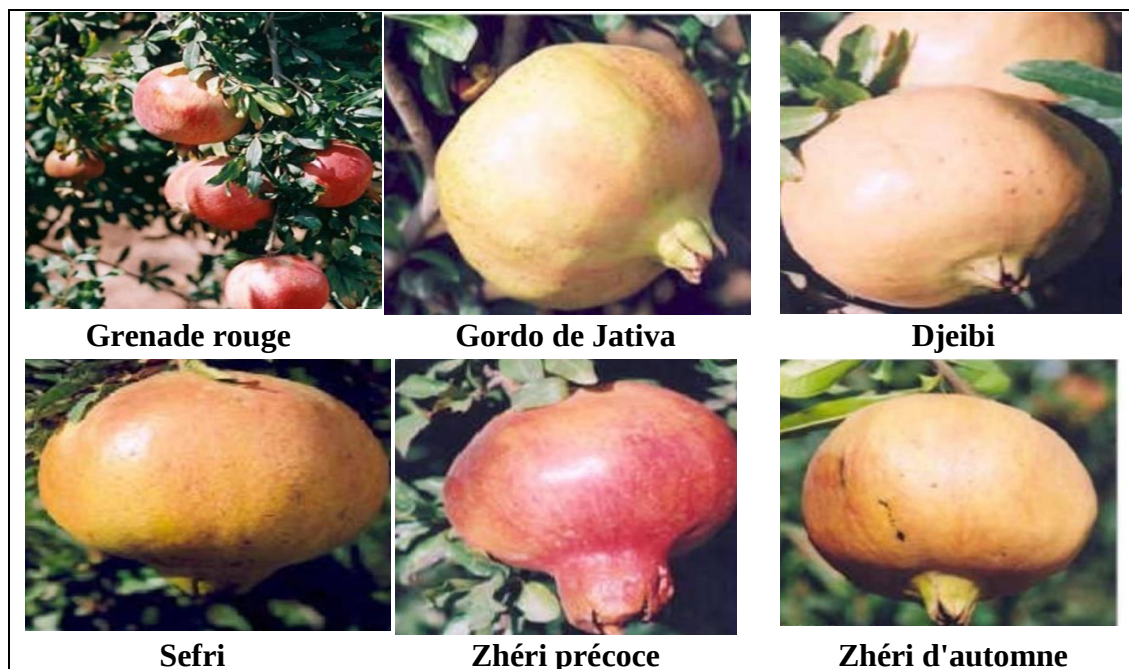


Figure 2. Quelques cultivars de grenade (Oukabli, 2004)

7. Écorce de grenade

L'écorce de grenade, qui représente environ 50% du poids du fruit, est une source précieuse de composés bioactifs. Elle est composée à 80% d'eau et de polysaccharides complexes (environ 8%), dont des pectines et de l'hémicellulose (Spilmon, 2013).

Elle est également riche en minéraux tels que le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphore et le sodium. Sa richesse en polyphénols est particulièrement remarquable. L'écorce contient environ 25% d'ellagitannins, tels que la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la granatine B, ainsi que des flavonoïdes spécifiques à la grenade comme la lutéoline, la quercétine et la punicaline (Seeram & Schulman, 2006).

On y trouve également deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique, ainsi que des anthocyanines responsables de la couleur rouge du fruit (Lansky & Newman, 2007). D'autres composés comme les acides gras, les catéchines, les quercétines et les rutines sont également présents (Hmid, 2013).



Figure 3.Écorce du Punica granatum (Zatoun & Ghanem, 2017).

8. Métabolites secondaires des plantes

Les métabolites secondaires des plantes sont des composés chimiques produits par les plantes en plus des métabolites primaires nécessaires à leur croissance et à leur développement. Ils jouent un rôle crucial dans l'interaction des plantes avec leur environnement, en assurant des fonctions telles que:

- Défense contre les agents pathogènes: en repoussant les attaques des insectes, des champignons et des bactéries.
- Dissuasion des herbivores: en conférant aux plantes un goût amer ou toxique.
- Attraction des pollinisateurs: en produisant des couleurs et des parfums attractifs.
- Protection contre les UV: en absorbant les rayons ultraviolets nocifs (Akroum, 2011).

❖ Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent un groupe important de métabolites secondaires. Ils sont classés (Figure 4):

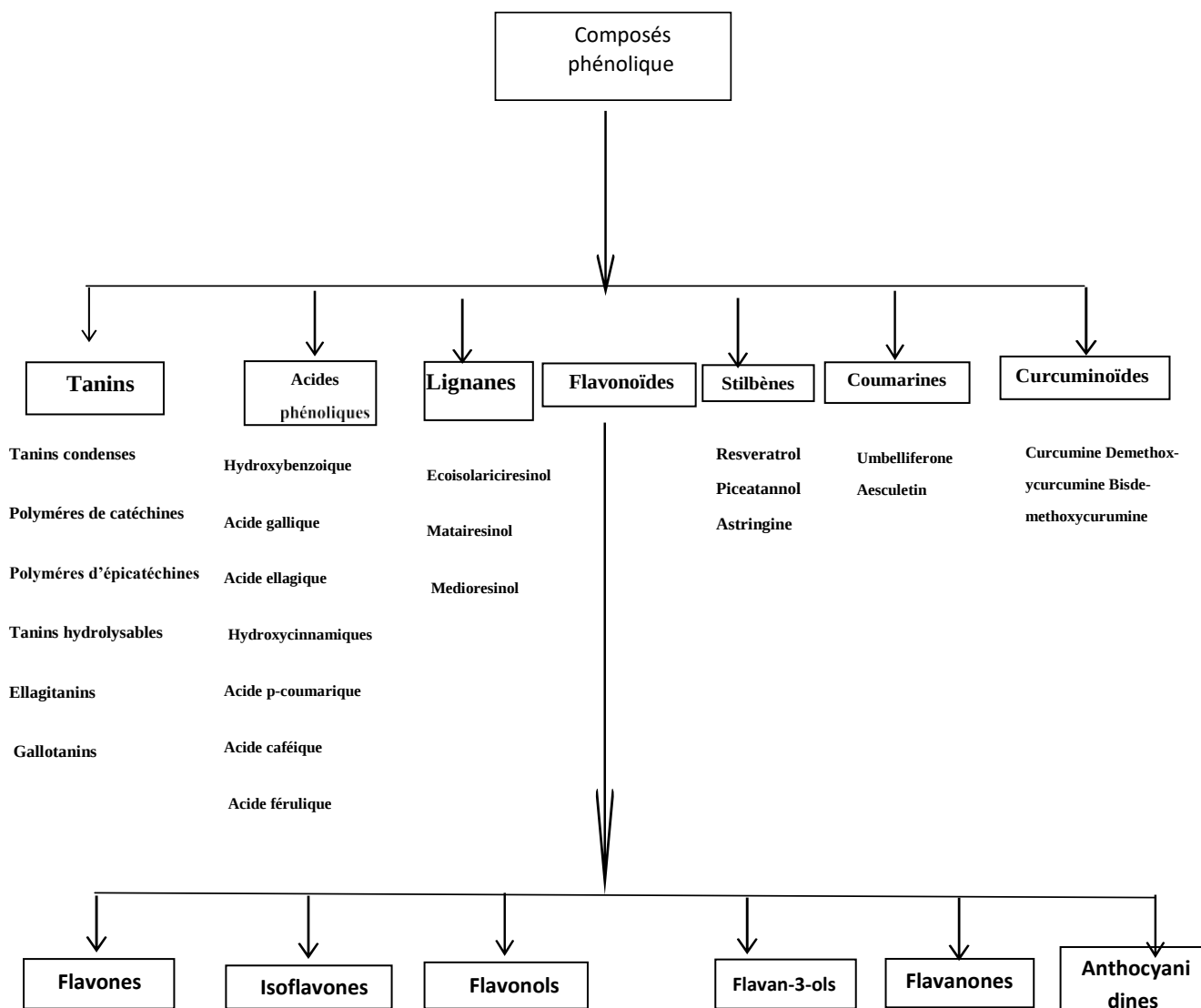


Figure 5. Les grandes familles de composés phénoliques (Fessard, 2017).

9.Utilisations de la grenade

9.1.Utilisations industrielles

9.1.1.Teintures naturelles

Les écorces des fruits sont utilisées pour teindre le textile. L'écorce de la grenade a été utilisée en Inde comme une teinture depuis les temps les plus anciens (Morton, 1987).

9.1.2. Tannage et la teinture des cuirs

D'après (Wald, 2009) l'écorce de grenade servait au tannage et à la teinture des cuirs. Ainsi, c'est l'écorce du fruit qui était employée, pour donner la couleur jaune aux cuirs marocains, utilisés par exemple pour la réalisation des chaussures "babouche".

9.2.Utilisation médicinale

L'ancienne science médicinale indienne l'a identifiée comme une plante médicinale, (Kulkarni et al., 2004). Dans le monde, la plus célèbre utilisation a été celle d'un vermifuge, tueur et expulseur des vers intestinaux. Les alcaloïdes contenus dans l'écorce du fruit induisent le relâchement du ténia et de son emprise sur la paroi intestinale, ce qui facilite son expulsion (Lansky et al., 2000). L'écorce de grenade a été utilisées en décoction pour traiter les diarrhées, les troubles digestifs et stopper les hémorragies. (Stover & Mercure, 2007). D'autres utilisations ont été mentionnées dans la littérature : empêcher la fécondation et avorter, traitement des morsures de serpent, du diabète, de la lèpre et de brûlures (Lansky et al., 2000).

9.3.Utilisation dans les produits cosmétiques

Plusieurs tests démontrent la capacité des polyphénols et particulièrement de l'acide ellagique et de ses dérivés, composés présents dans l'écorce du fruit.

9.3.Autres utilisations

- Au Japon, un insecticide est dérivé de l'écorce de l'arbre(Stover et Mercure, 2007).
- Les études récentes ont démontré l'effet thérapeutique de quelques-unes de ces utilisations (Stover et Mercure, 2007).

11.Maladies traitées par *P. granatum*

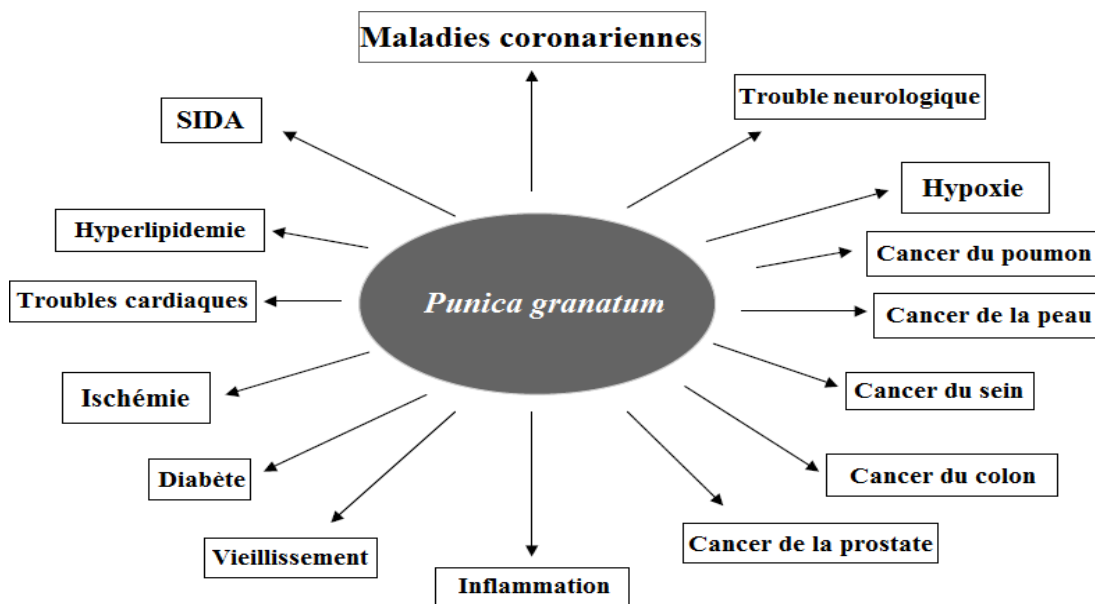
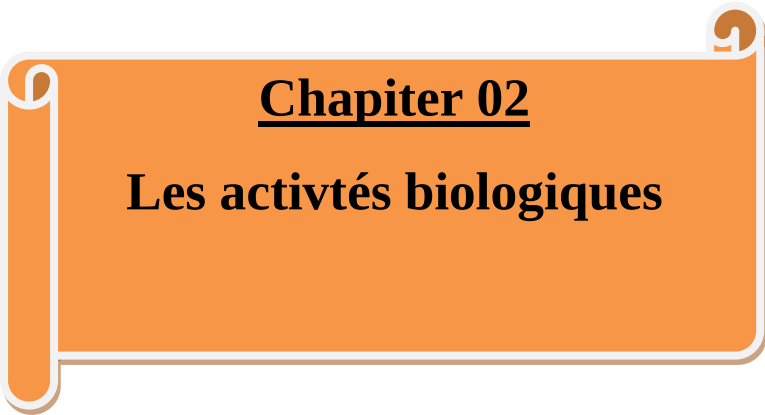


Figure 6.Maladies traitées par *P.granatum* (Seeram et al., 2006).

Tableau 2: Propriétés pharmacologiques

Partie de la plante	Activité / effet	Résultats de l'étude	Références
Graines et écorces	Antidiabétique	L'extrait des graines et d'écorces a montré une réduction de l'augmentation de la glycémie induite par l'alloxane. L'extrait d'écorce a présenté une activité significativement meilleure que l'extrait de graines.	(Das et Sama, 2009).
Écores	Protection contre la néphrotoxicité	L'administration d'écorce de fruits a montré une amélioration notable des anomalies liées à la néphrotoxicité.	(El Habib, 2013).

(Douaouri, 2018).

An orange scroll graphic with a white border and a white shadow. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges showing a white inner layer. The text is centered on the scroll.

Chapiter 02

Les activtés biologiques

I. Activité antioxydante

La biologie des radicaux libres présente un large champ d'intérêt en raison de son rôle actif dans les phénomènes aigus et dans de nombreuses maladies chroniques telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires **(Guinebert et al., 2005)**.

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes, car ils sont bénéfiques pour l'organisme en quantités spécifiques car il existe un équilibre entre antioxydants et pro-oxydants **(Favier, 2003)**.

Dans une situation anormale, un déséquilibre se produit dans cet équilibre, qu'il s'agisse de l'incapacité des antioxydants à faire leur travail ou d'une production excessive de radicaux libres, et cet excès de radicaux est appelé stress oxydatif **(Favier, 2003)**.

I.1. Stress oxydant

Stress oxydant a été défini comme étant un déséquilibre entre les oxydants que sont les espèces oxygénées activées (EOA incluant radicaux libres, peroxyde d'hydrogène, oxygène singulet, acide hypochloreux) et les antioxydants **(Pincemail et al., 2014)**.

Les systèmes de défense jouent un rôle majeur dans la protection contre les dommages oxydatifs moléculaires **(Derouiche et al., 2018)**, ce qui conduit à dommages cellulaires irréversibles par les radicaux libres pouvant causer des dommages importants.

à la structure cellulaire et au métabolisme en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et les acides nucléiques **(Angelos et al., 2005)**. Le stress oxydatif est impliqué comme un mécanisme physiopathologique de différentes maladies et constitue un sujet d'actualité d'intérêt, si le stress oxydatif n'est pas une maladie en soi, il constitue un facteur favorable terrain propice au développement de diverses pathologies **(Derouiche et al., 2018)**. Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) **(Kohen et Nyska, 2002) (Figure 7)**.

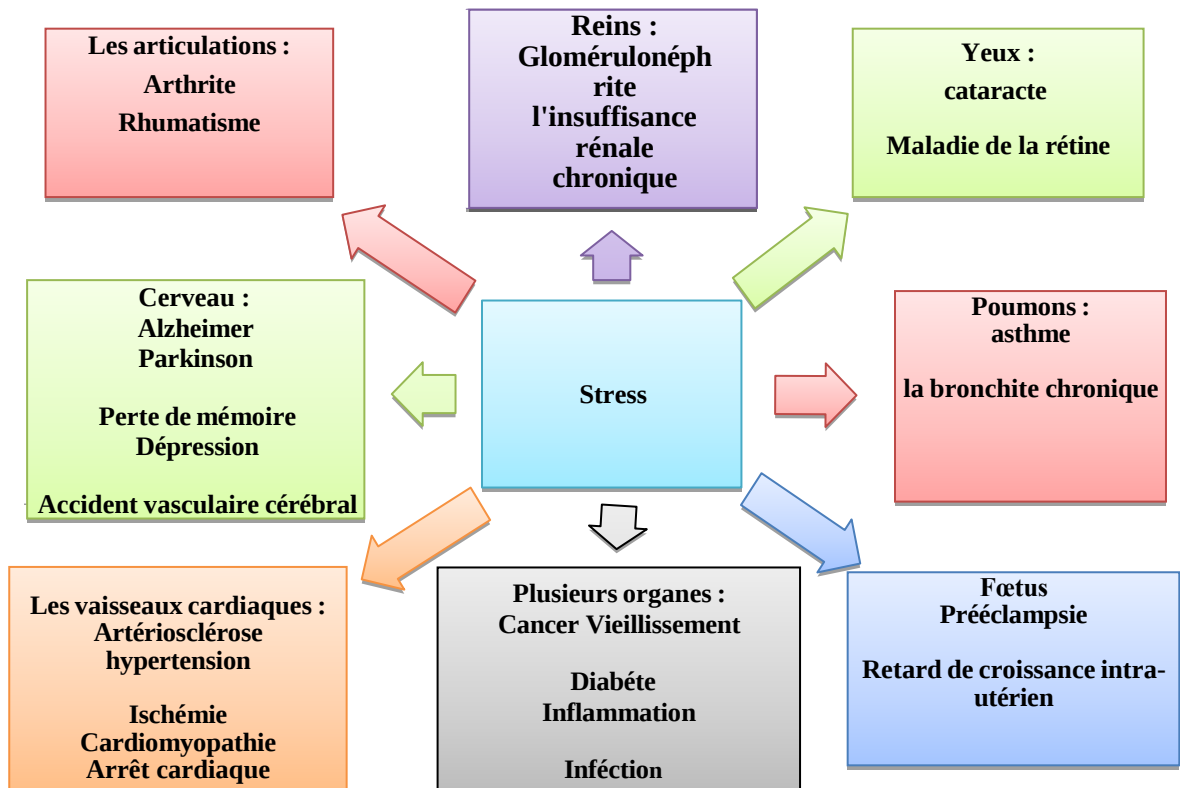


Figure 8. Stress oxydatif et ses conséquences (Nagar et al., 2017)

I.2. Radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié, Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

I.2.1. Sources de radicaux libres

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde $\text{ROO}\bullet$, radical alkoxyle $\text{RO}\bullet$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997). L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, radical hydroxyl $\text{OH}\bullet$, monoxyde d'azote $\text{NO}\bullet$, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non ra-

dicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet 1O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxydinitrite $ONOO^-$ (Favier, 2003).

I.2.1.1. Sources endogènes

ROS comprennent les mitochondries, le métabolisme du cytochrome P-450 (lors de la détoxication des xénobiotiques), les peroxysomes, les réactions impliquant le fer et d'autres métaux de transition, l'activation des cellules inflammatoires (les macrophages neutrophiles contiennent une classe d'enzymes connue sous le nom de The). plasmique la membrane et le réticulum endoplasmique, ainsi que le complexe NADPH oxydase, qui, lors de son activation, produit des radicaux qui sont des superoxydes et des peroxydes d'hydrogène (Barouki & Morel, 2001; Bhattacharya, 2015).

I.2.1.2. Sources exogènes

Des facteurs externes tels que les bactéries buccales, les rayonnements ionisants et ultraviolets, la nourriture, l'alcool, les substances lourdes métaux, et certains médicaments chimiothérapeutiques peuvent également générer des ROS et RNS (Żukowski et al., 2018 ; Santo et al. 2016), la couche d'ozone, les pesticides, l'anesthésie, les solvants industriels et les facteurs environnementaux comme les polluants atmosphériques ou la fumée de cigarette (Birben et al., 2012), ainsi que des facteurs physiologiques (états mentaux comme le stress et les émotions, etc.) (Kumar, 2011).

I.3. Antioxydants

Toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat est appelée antioxydant (Halliwell, 1990). Les antioxydants sont donc nucléophiles et des molécules réductrices et suffisamment stables capables de réagir avec les oxydants, ce qui sont généralement électrophiles, leur donnant un ou deux électrons (Espinosa-Diez et al., 2015). Ce qui lui fait jouer un rôle très important dans la protection biologique systèmes contre la toxicité et les effets nocifs des radicaux libres, en les réduisant et ainsi prévenir ou traiter les maladies liées au stress oxydatif (Valko, 2007 ; Birben et al., 2012). Les antioxydants sont présents en quantités importantes dans fruits, légumes, boissons (jus, thé, café), noix et produits céréaliers (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

.3.1. Classification des antioxydants

3.1.1. Antioxydant enzymatique

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), le glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GRx) **(Pham-Huy et al., 2008)** à l'intérieur des mitochondries se trouve un glutathion peroxydase qui agit pour réduire le H₂O₂ dans l'eau et les peroxydes lipidiques aux alcools correspondants **(ghodaro & Akin-loye, 2017)** l'O₂ est converti par la SOD en H₂O₂ car il contient des minéraux qui catalyser l'élimination du superoxyde, ainsi que converti par CAT en eau et en oxygène, qui empêche la production de radicaux hydroxyles **(Krishnamurthy & Wadhwani, 2012 ; Liguori et al., 2018)** La catalase, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire **(Delattre et al., 2005)**.

I.3.1.2. Antioxydants non enzymatiques

A. Antioxydants endogènes

Ils sont produits par métabolisme dans le corps **(Gupta et al., 2017)** L-carnitine, acide alpha-lipoïque, bilirubine, de l'α-tocophérol, de l'albumine **(Kedar, 2015 ; Xuejun et al., 2015)**. Ce sont des molécules qui interagissent avec RONS et mettent fin aux réactions radicalaires. Il comprend des non-antioxydants enzymatiques GSH ou composés nutritionnels produits de manière endogène **(Zhao & coll., 2017)**.

B. Antioxydants exogènes

ce sont des composés qui ne peuvent pas être produits dans le corps et doivent être apportés par des aliments ou des suppléments **(Gupta et al., 2017)** molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes **(Dacosta, 2003)**. Ce sont des composés polyphénoliques, qui comprennent des minéraux (sélénium, cuivre, fer, manganèse, zinc) Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β-carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques, ...etc. **(Kohen & Nyska, 2002)**.

I.3.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition **(Favier, 2006)**.

I.3.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo, l'activité antioxydante d'aliments, d'extraits ou de composés individuels. Ces tests peuvent se diviser en deux catégories: les tests mesurant le transfert d'électrons ou d'hydrogène vers un radical coloré stable facile à détecter (DPPH, FRAP) et ce faisant intervenir une compétition (Oxygen Radical Capacité d'absorption ORAC, fabriqué de β -carotène et de crocine) entre l'antioxydant et une cible à protéger (pigments, lipides) (**Bensouici, 2015**) techniques d'évaluation de l'activité antioxydante diverses techniques sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante d la fois in vitro et in vivo.

Tableau 3 Quelques tests d'antioxydants in vitro

Tests	DPPH	ABTS	FRAP	ORAC
Mécanismes Réactionnels	Transfert d'électron majoritaire	Transfert d'électron et de proton	Transfert d'électron	Transfert de proton
Nature des molécules testées	Hydrophiles et lipophiles	Hydrophile et lipophiles	Hydrophiles	Hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	CI50 et/ou en mg ou μ mol équivalent d'une molécule de référence	CI50 et/ou en mg ou μ mol équivalent d'une molécule de référence	En mg ou μ mol équivalent Fe^{2+}	CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent d'une molécule de référence
Avantages	Très facile à mettre en œuvre, peu coûteux	Très facile à mettre en œuvre, cinétique de réaction très rapide, peu coûteux	Très facile à mettre en œuvre, peu coûteux	Facile à mettre en œuvre, coûteux (nécessité d'un fluorimètre), Utilisation d'un générateur de radicaux ($ROO\bullet$)

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>	Ph utilisé non physiologique, interférences possibles à 595 nm, interférences avec composés possédant $E^\circ < 0,77V$.	Mécanismes de génération des ROO• non physiologique, interférences possibles des protéines.
---------------	--	---	---	---

(Prior et al., 2005)

II. Activité antimicrobienne

Les infections bactériennes sont causées par divers micro-organismes et sont la cause racine des maladies les plus mortelles et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques ont été développés pour les traiter, mais c'est leur mauvaise utilisation que ce qui a conduit à ce problème. de l'émergence de la multirésistance bactérienne (Rahal, 2006).

II.1. Antibiotiques

Produit chimique synthétisé par des micro-organismes ou produit artificiellement, un antibiotique est une substance qui inhibe ou élimine la croissance des micro-organismes. Les antibiotiques peuvent être classés en fonction de leur origine, de leur composition chimique et de leur mode d'action et le spectre d'action. Cependant, la classification des antibiotiques la plus largement utilisée est basée sur leurs mécanismes d'action (Tamert et al., 2017). Les médicaments antimicrobiens tuent les bactéries en attaquant directement leurs composants structuraux clés (membrane plasmique, ribosomes, parois cellulaires et ADN) et/ou en interférant avec leurs processus métaboliques et, par conséquent, leur capacité à fonctionner (Tortora et al., 2003).

II.2.Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

II.2.1.Méthode de dilution en milieu gélosé

Les dilutions antimicrobiennes sont ajoutées à une gélose Mueller-Hinton qui est bouillie dans une boîte de Petri. Chaque boîte contient une concentration antibactérienne unique. La surface de la gélose est renforcée par des matrices de suspension bactériennes. Dix souches peuvent être mis à l'épreuve sur une boîte. Le CMI est équivalent à la concentration antibactérienne la plus faible qui empêche la croissance bactérienne (pas de colonie à la surface) (Rahal, 2006).

II.2.2.Méthode de dilution en milieu liquide

Dans un environnement liquide, la croissance bactérienne est visible sous la forme d'une tache ou d'une colonie bactérienne. En diluant, on peut obtenir une gamme de concentrations d'antibiotiques qui diminuent. les uns après les autres (Balouiri et al., 2016).

II.2.3 Méthode E-test

Une bandelette est contaminée par des quantités croissantes d'antibiotiques.Elle est posée sur une gélose pour antibiogramme classiquement ensemencée. L'antimicrobien se propage en formant un gradient de concentration : la zone d'inhibition a la forme d'une ellipse et la lecture se concentre sur la bandelette là où la zone d'inhibition la rencontre.À la jonction de la bandelette et de la zone d'inhibition, la concentration antibactérienne correspond au CMI de la souche étudiée (Caron, 2012).

III. Activités anti-inflammatoires

III.1.Inflammation

Lorsqu'une attaque externe se produit, le corps utilise le mécanisme de défense physiologique complexe appelé inflammation pour éliminer ou isoler l'agresseur et préserver l'intégrité des tissus infectés. Ses caractéristiques incluent des rougeurs, un œdème, une plumerie et une souffrance et une perte de fonction (Besbas, 2020)

De nombreux systèmes biologiques qui interviennent à différents moments et degrés sont activés par une réponse inflammatoire, y compris des réactions biochimiques, l'activation cellulaire, la coagulation, la fibrinolyse et autres détruire ou éliminer la substance étrangère (Weill & Batteux, 2003).

Cependant une activation trop longue ou trop importante peut entraîner des altérations plus ou moins permanentes. Étant donné que l'objectif de l'inflammation est d'éliminer les agents pathogènes et de réparer les lésions, il s'agit généralement d'une activité bénéfique. Ce-

pendant, cela peut être négligé en raison de l'agression, de la persistance ou de la régulation aberrante des processus inflammatoires de l'agent pathogène. Elle active à la fois les mécanismes du système immunitaire inné et les mécanismes du système immunitaire plus complexes et à action plus longue qui constituent l'immunité adaptative **(Weill & Batteux, 2003)**.

III.2.Types d'inflammation

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoires :

III.2.1.Inflammation chronique

D'un point de vue morphologique, la présence de plasmocytes, de macrophages et de lymphocytes dans les tissus caractérise une inflammation chronique. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire des affections chroniques peut durer pendant des périodes prolongées (des mois ou des années). On pense qu'elle est causée par le fait de s'engager de manière persistante dans des réponses immunitaires acquises et enracinées **(Ferradji, 2011)**. L'inflammation chronique est une réponse ubiquiste de l'organisme face à un agent persistant **(Pépin, 1993)**.

III.2.2.Inflammation aigue

La réponse immédiate du corps à l'agent agressif est une inflammation aiguë. Selon la gravité de l'infection, sa durée peut varier de quelques jours à plusieurs semaines. **(Raghavendra et al., 2015)** Ses principales caractéristiques sont l'exsudation des protéines et des liquides plasmatiques (œdème) et la migration des leucocytes, en particulier des neutrophiles, des vaisseaux sanguins vers le site de l'inflammation (tissu infecté). **(Raghavendra et al., 2015)**. Le système immunitaire inné contribuera à l'élimination immédiate de l'agent pathogène, mais peut également initier une réponse adaptative qui contribuera à l'élimination de la menace **(Noack et al., 2018)**. Les infections aiguës guérissent d'elles-mêmes ou avec un traitement, même si elles peuvent laisser des cicatrices en cas de lésions tissulaires importantes. L'inflammation aiguë comporte trois étapes:

III.2.2.1.Phase vasculaire

Est instantanée et associée à l'apparition des principaux symptômes qui conduisent à l'apparition de la congestion et de l'œdème **(Sellal, A. H. 2009)** . Le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires telles que les monocytes et les neutrophiles par l'utilisation de facteurs promoteurs de croissance et de cytokines produites par des plaquettes. L'activation de la fibri-

nolyse décompose les filaments de fibrine et produit de la plasmine, qui active le complément et provoque sa libération (**Figure 9**).

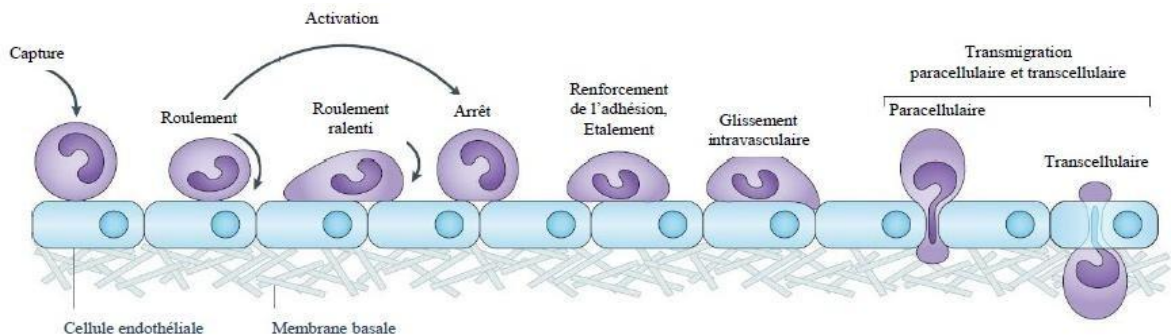


Figure 10. Migration des leucocytes des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire. (Douaouri, 2018).

III.2.2.2. Phase cellulaire

L'origine des cellules inflammatoires du foyer provient de deux sources : soit le tissu lui-même, comme les cellules phagocytaires, soit le sang comme les neutrophiles. (Duyckaerts, et al., 2002).

❖ Cellules de sang

Phénomène qui provoque la migration des cellules polynucléaires, des monocytes et lymphocytes dans le ganglion lymphatique est appelé chimiotaxie. Aux stades subaigu et chronique, des infiltrats lymphocytaires sont observés (Duyckaerts et al., 2002 ; Roussel et al., 2005).

❖ Cellules originaires du tissu

Histiocytes sont des macrophages qui vivent dans les tissus qu'ils habitent, comme les microglies du cerveau, les macrophages alvéolaires du poumon et les cellules de Küpffer du foie. Les mastocytes, qui ont des granulations d'histamine et de sérotonine hautes, sont trouvés dans les tissus (Duyckaerts et al., 2002).

III.2.2.3. La phase de résolution et réparation

Après l'élimination de l'agression, les macrophages nettoient les débris et sécrètent des cytokines pour la réparation tissulaire (Noack & Kolopp-Sarda, 2018). Les cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10, remplacent les médiateurs inflammatoires et inhibent leur action (Noack & Kolopp-Sarda, 2018). Les cellules immunitaires quittent le site ou meurent

(Noack et al., 2018). La résolution complète restaure l'homéostasie tissulaire (Noack & Kolopp-Sarda., 2018).

Les cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10, jouent un rôle crucial dans ce processus en régulant l'activité des médiateurs inflammatoires et en favorisant la réparation tissulaire (Noack & Kolopp-Sarda., 2018).

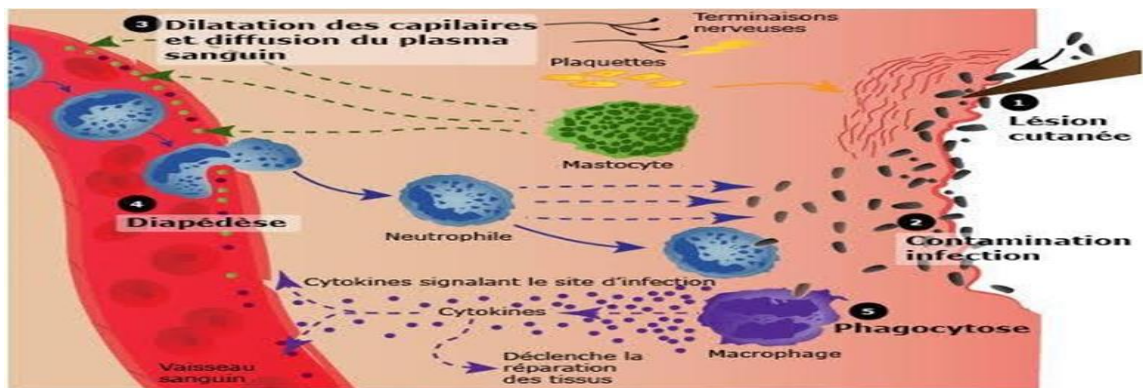


Figure 11.Étape de Anti-inflammatoire aigue (patrice,2014).

III.3.Cellules et médiateurs de l'Inflammation

III.3.1.Cellules de l'inflammation

- **Polynucléaires neutrophiles (PNN)**

Sous-type important de globules blancs, sont les premiers à répondre aux infections et à l'inflammation (Fiset et al., 2003 ; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004). Leur prolifération sur les sites infectés est cruciale dans la réponse immunitaire, influençant le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires. De plus, ils jouent un rôle dans la différenciation des macrophages et sont impliqués dans la réparation de la thyroïde (Nathan, 2006).

- **Mastocytes**

Dispersés dans les tissus vascularisés, tels que les muqueuses, la peau et les voies respiratoires, les mastocytes, sentinelles immunitaires, se retrouvent également dans le système nerveux, les articulations et les os (Frenzel et Hermine, 2013 ; Da Silva et al., 2014). Leur rôle crucial réside dans le maintien de l'homéostasie par la dégranulation, libérant un arsenal de médiateurs inflammatoires, dont l'histamine, l'héparine, des cytokines et des protéases de neutrophiles (Krystel-Whittemore et al., 2016). Ces médiateurs orchestrent une réponse immunitaire complexe face aux infections, aux allergies et aux lésions tissulaires.

- **Lymphocytes**

Troisième ligne de défense immunitaire et se divisent en deux groupes : les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les lymphocytes T se forment dans le thymus et sont essentiels pour la réponse immunitaire à médiation cellulaire, tandis que les lymphocytes B mûrissent dans la moelle osseuse et jouent un rôle dans la production d'anticorps. Les lymphocytes T régulent les fonctions des lymphocytes B et des macrophages, tandis que les lymphocytes B activent les macrophages via la libération de cytokines(**Chaplin, 2010**).

III.3.2. Médiateurs de l'inflammation

❖ Cytokines et chimiokines

molécules de signalisation cruciales dans la réponse inflammatoire. Les cytokines, telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α , sont produites par diverses cellules, activant les leucocytes et l'endothélium. L'IL-10 agit comme une puissante cytokine anti-inflammatoire en inhibant les cytokines pro-inflammatoires. Les chimiokines, comme les chimiokines CC et CXC, guident les leucocytes vers les zones inflammatoires, régulant ainsi leur migration et leur infiltration dans les tissus affectés (**Zhao et al., 2007**).

❖ Peptides vasoactifs

Jouent un rôle crucial dans la réponse inflammatoire. Certains sont stockés dans des vésicules de sécrétion (comme la substance P), tandis que d'autres sont produits par protéolyse de précurseurs inactifs (comme les kinines). Ils provoquent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire, souvent en induisant la libération d'histamine par les mastocytes. Le facteur Hageman coordonne ces réponses en activant la cascade de kallikréine-kinine, produisant notamment la bradykinine qui agit sur le système vasculaire et stimule la douleur, alertant ainsi l'organisme sur l'état anormal du tissu endommagé (**Medzhitov, 2008**).

❖ Enzymes protéolytiques

Comme l'élastase, les cathepsines et les MMP, dégradent la matrice extracellulaire, favorisent la migration des leucocytes, contribuent au remodelage tissulaire et renforcent la réponse immunitaire contre les agents pathogènes(**Medzhitov, 2008**).

III.3.3. Anti-inflammatoires

La thérapie anti-inflammatoire vise à prévenir la transition de la phase aiguë de l'inflammation vers une phase chronique en limitant la réponse spécifique des tissus (**Muster, 2005**). Typiquement, elle est guidée par des molécules de synthèses de type non-stéroïdiens ou anti-inflammatoires stéroïdiens (Corticoïdes). Il s'agit de médicaments couramment utilisés avec

des effets secondaires parfois graves, notamment liés à leur toxicité sur les systèmes rénal et digestif (une irritation digestive peut entraîner une ulcération gastrique) (Trabsa, H. 2015).

III.3.3.1. Définition

Selon les définitions, les médicaments anti-inflammatoires sont définis comme des composés qui agissent sur la douleur et l'enflure qui se développent après l'attaque d'un agent pathogène. Ils empêchent la dégradation ou l'activation de certains médiateurs chimiques de l'inflammation, comme les prostaglandines) et donc réduisent l'inflammation et l'impression de douleur (Diallo, 2020) .

III.3.3.2. Types d'anti-inflammatoires

A. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Moins de glucocorticoïdes protègent la peau des anti-inflammatoires (AIS) et utilisent le cortisol. En ce qui concerne les maladies auto- immunes et les arthrites rhumatoïdes chroniques, est constituant le traitement le plus efficace (Trabsa, 2015). Lors de l'introduction de l'AINS, l'utilisation de glucocorticoïdes est liée à un certain nombre d'effets indésirables. Plus la période de traitement est longue et plus le risque est élevé, plus le risque que ces effets secondaires puissent se produire est élevé (Mouffouk, 2019).

B. Anti-inflammatoires non-stéroïdien

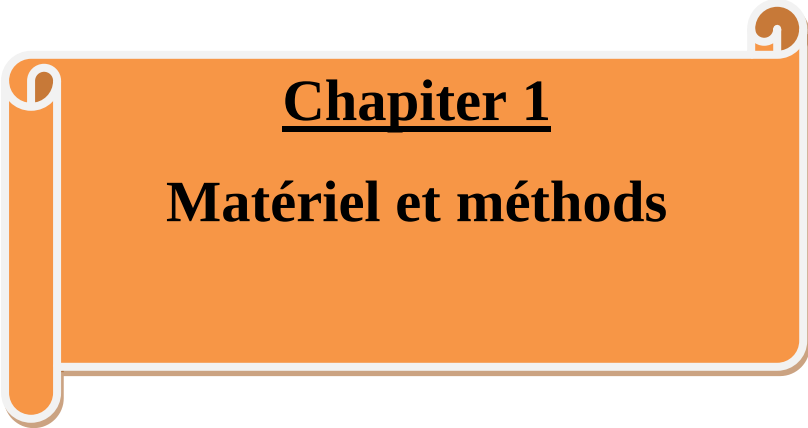
Ce sont certaines des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti- inflammatoires, analgésiques, antipyrétiques (contre la fièvre) et, pour certaines, antigrégantes plaquettaire propriétés. Il s'agit d'une classe de médicaments qui produit de nombreuses molécules telles que l'indométhacine, le diclofénac, l'ibuprofène et l'aspirine (Diallo, 2020).

C. Anti-inflammatoires poly phénoliques d'origine végétale

La médecine traditionnelle utilise des plantes pour traiter une variété de maladies inflammatoires. Les ingrédients actifs dans les plantes sont de nature chimique diversement . De nombreuses études ont démontré les propriétés anti- inflammatoires des polyphénols, et plus particulièrement les flavonoïdes, sur plusieurs modèles animaux inflammatoires

Ces propriétés anti- inflammatoires sont liées à leur capacité à moduler le fonctionnement du système immunitaire. De nombreux mécanismes d'action cellulaires (Benkhaled, 2018).

Partie expérimentale

An orange scroll graphic with a white border and a small orange circle at the top right corner. The text is centered on the scroll.

Chapiter 1

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

Le 6 novembre 2023, des grenades ont été achetées au marché d'El Oued. Leurs écorces rouges ont été soigneusement lavées, puis séchées à l'ombre pendant 7 jours dans des conditions rigoureuses : absence de lumière, de soleil et d'humidité, et sur une surface propre pour éviter les impuretés et la poussière. Ensuite, les écorces ont été broyées en une poudre de taille moyenne et stockées dans des bocaux en verre foncé pour une étude ultérieure de leurs propriétés et applications.

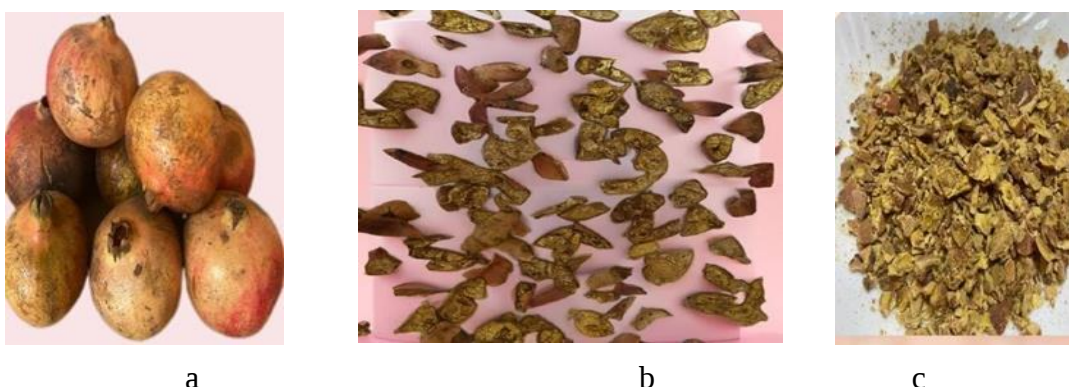


Figure 12. Obtention d'une granulométrie moyenne à partir de l'écorce de grenade séchée

a : Grenade utilisée / **b :** Séchage de l'écorce de grenade / **c :** Écorce de grenade séchée et broyée à granulométrie moyenne

1.1.2. Matériel animal

Ont été utilisées dans l'étude in vivo 20 souris femelles de la souche *Wistar albino* âgées de 7 semaines et pesant entre 110 et 135 grammes, issues de l'Institut Pasteur d'Alger. Elles ont été placées dans des cages leur permettant de se déplacer librement pour manger et boire. Ces souris ont bénéficié d'une période d'adaptation de 15 jours. Ils ont été élevés dans une animalerie de niveau collégial Sciences naturelles et de la vie à l'Université Echahid Hamma Lakhdar El Oued, Dans des conditions environnementales standards: à une température de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ et à la lumière Durée : 12 heures / 24 heures Ils ont été constamment surveillés et nourris, et leur espace de vie a été nettoyé et stérilisé pendant toute la durée de l'expérience étudiée.



Figure 13. Les souris utilisé dans étude in vivo

1.1.3. Matériel d'activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne et fongique de l'extrait d'écores de grenade, 5 souches des microorganismes ont été sélectionnées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), conservées à -4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée et fournies par l'institut Pasteur. Les 05 souches de microorganismes étudiées sont présentées dans le tableau suivant:

Tableau 4: les souches des microorganismes utilise à l'étude d'activité antimicrobienne *in vitro*

Espèce Des microorganismes	Références	Caractéristiques
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Bacilles à gram négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bacille pyocyanique gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25932	Cocci à gram positif
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 25973	Gram- positives
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Un type de champignon et une forme de levure

1.1.4. Matériel de laboratoire

Les appareils

- ✓ Balance sensible.
- ✓ Bain-marie
- ✓ Etuve
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ spectrophotometer UV-vis
- ✓ Agitateur
- ✓ Bec Bunsen
- ✓ Autoclave
- ✓ Fume hood
- ✓ Réfrigérateur
- ✓ VITEK® DENSICHEK®
McFarland

1.2. Les Produits chimiques

Tableau 5 : Les produits chimiques utilise dans étude in vitro et in vivo

Flavonoïdes total	Polyphénol total	Tanins condensés	DPPH
- AlCl ₃ (2%)	- Réactif Folin- Cio-calteu (10%) - Na ₂ CO ₃ (7,5 %)	- Vanilline - Acide Hydro-chlorique	- Méthanol - DPPH
FRAP	β-carotène	Antimicrobienne	Anti-inflammatoire
- Tampon de solution de phosphate (0,2 M ; pH : 6,6) - K ₃ Fe (CN) ₆ à 1 % - TCA, à 10% - fraîchement préparée(FeCl ₃ , 6H ₂ O) à 0,1%	- β- carotène - chloroforme -acide lactique -Tween 80. -BHT	- DMSO (20 %) - Gélose Mueller-Hinton - Gélose Sabouraud - Glucose - Boîtes de Pétri - Pipette Pasteur - Solution saline physiologique stérile (NaCl à 0.9 %) - Bouclé stérile - Ecouvillon stérile - Standard McFarland N° 0.5 (1.5×10 ⁸ CFU/mL) - Eau distillée stérile	- λ- carragénine - Solution saline physiologique stérile (NaCl à 0.9 %) - Médicament de Diclofénac sodium

2. Méthodes

Une série de tests a été réalisée sur les écorces de grenade pour étudier leurs composés polyphénols, leurs propriétés antioxydantes, l'études microbiologie et anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*

In vitro

2.1. Préparation l'extrait des écores de grenade

Après avoir obtenu la poudre de écores de grenade (**Figure 09**), Macéraction 10 g d'écorces de grenade dans 100 ml d'eau distillée à température ambiante dans l'obscurité pendant 24 heures (répéter 3 fois). Le solvant a été filtré sur papier Whatman, évaporé et concentré dans tuve à 50°C.(**Chouikh et al .,2018**)



Figure 14. Étapes obtenu extrait des écores de grenade

2.2. Rendement d'extraction

Le pourcentage de rendement pour extrait a été calculé par la formule suivantes selon(**Guettaf et al., 2016**):

$$\text{Rendement (\%)} = (M1 / M0) \times 100$$

- **M1:** Masse en gramme de l'extrait sec résultant
- **M0 :** Masse en gramme du matériel végétal à traiter

3. Dosagesdes composé phénolique

3.1 Dosage polyphénol total

3.1.1. Principe

L'ensemble du mélange de composés phénoliques est oxydé via la réaction de Folin- Cioalteu. Ce dernier est de couleur jaune et est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdate ($H_3PMO_{12}O_{40}$), qui sont réduits lors

de l'oxydation des phénols en un mélange bleu d'oxydes de tungstène et de molybdène (**Ribèreau-Gayon, 1968**). La teinte bleue produite est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents avec une absorbance maximale d'environ $\lambda=765$ nm (**Ojeil et al. 2010**). La réaction d'oxydation est accélérée dans un environnement alcalin (dans notre cas, en ajoutant du Na_2CO_3) (**Collin & Crouzet, 2011**). Et l'acide gallique est fréquemment utilisé comme référence pour générer des courbes d'étalonnage

3.1.2. Mode opératoire

La quantité totale de composés phénoliques dans l'extrait a été déterminée selon la méthode Folin-Ciocalteu méthode de Singleton-Rossi (**Chouikh&Rebiai., 2020b**) avec une petite modification : 0,2 ml de solution d'échantillon ont été ajoutés à un tube expérimental contenant 1,0 ml de réactif Folin-Ciocalteu (10%) et 0,8 ml de Na_2CO_3 (7,5%). Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, un spectrophotomètre a été utilisé pour mesurer l'absorbance à $\lambda=765$ nm.

La courbe de gravure a été préparée à l'aide de solutions d'acide gallique à une force de 0,02 à 0,12 mg/ml. La teneur totale en polyphénols est exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique (AG E)/g d'extrait)

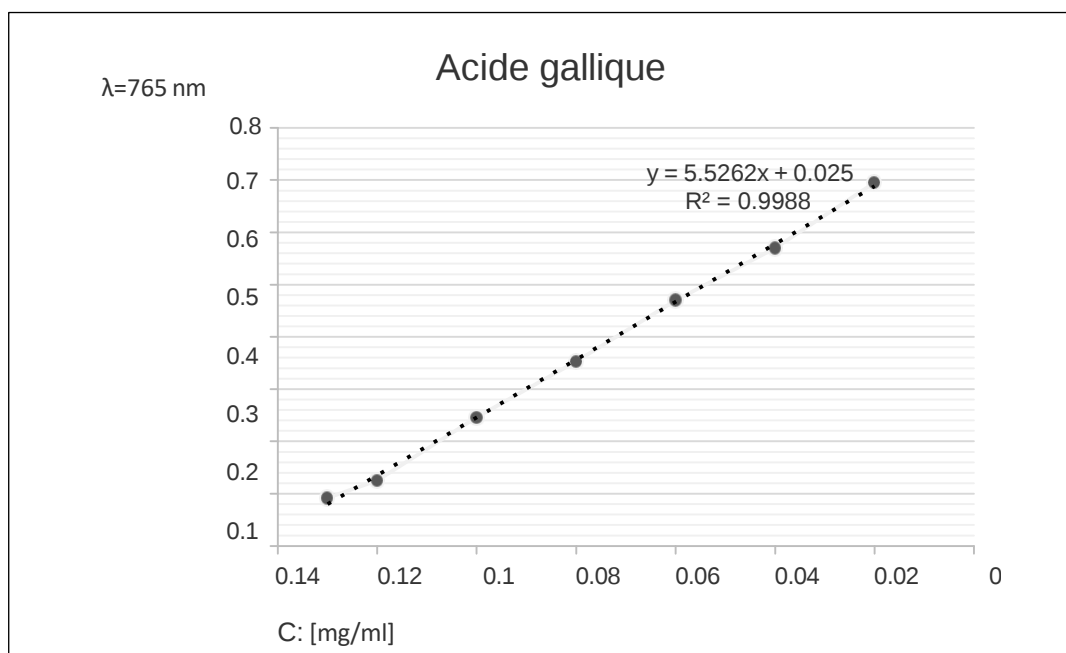


Figure 15. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

3.2. Dosage de flavonoïdes total

3.2.1. Principe

En position 5, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre qui peut former, avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Une coloration jaunâtre se développe après l'ajout de la solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃). Cette coloration est due au complexe formé entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes; cela s'exprime par la perte de deux électrons par le métal (Al) pour s'unir à deux molécules d'oxygène agissant comme donneurs d'électrons (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La formule du complexe entre le chlorure d'aluminium et un composé phénolique O- hydroxy carbonylé est la suivante:

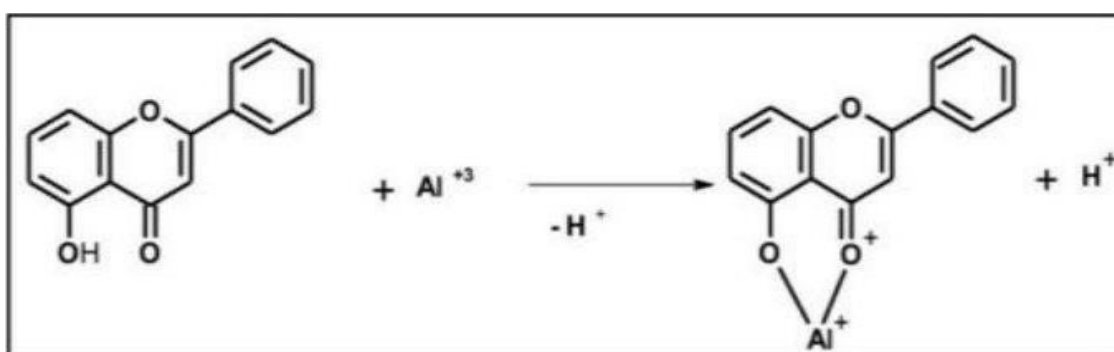


Figure 16. Réaction du Chlorure d'aluminium et les Flavonoïdes (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

3.2.2. Mode opératoire

Les flavonoïdes ont été quantifiés à l'aide d'AlCl₃; ceci est basé sur la combinaison de 750 µL concentration différentes d'extraits bruts avec 750 µL de solution AlCl₃ (2%), après que la bonne nuance du mélange est laissée pendant 1h dans l'obscurité à la température de laboratoire, et l'épaisseur d'absorption de la lumière est à 420 nm de long par un spectrophotomètre UV-Vis. La quantité de flavonoïdes totaux est exprimée en nombre de milligrammes équivalent à la quercitrine par gramme d'extrait végétal, ou la courbe étalon de la quercitrine est déterminée à partir d'une série de concentration en terme d'absorbance optique (**ALIA et al., 2021**)

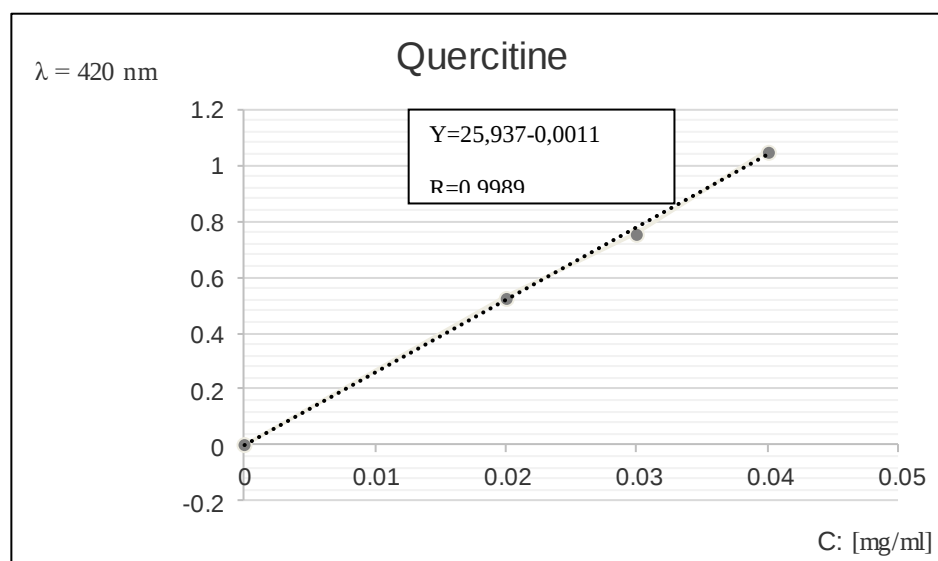


Figure 17. Courbe d'étalonnage de quercitine pour le dosage des flavonoids

3.3. Dosage des tanins condensés

3.3.1. Principe

Le dosage des tanins condensés dans l'extrait écorce de grenade est réalisé à l'aide de la méthode de (Schofield et al.,2001) . Le fondement de ce dosage est la fixation du groupe aldéhydique de la vanilline sur le carbone 6 du cycle de catéchine. pour créer un chromophore rouge complexe qui absorbe la lumière à 500 nm

3.3.2. Mode opératoire

Verser 3 ml de vanilline (4 % dans le méthanol) et 1,5 ml de condensé acide hydrochlorique à 400 μL de échantillon ou standard. Le mélange est incubé pendant 15 minutes. L'absorbance est de 500 nm. Les concentrations de tanins condensés sont calculées sur la gamme d'étalonnage établie avec catéchine (0-0,5 mg/ml) et exprimées en milligrammes de catéchine équivalente par gramme d'extrait (mg E C/g extrait)

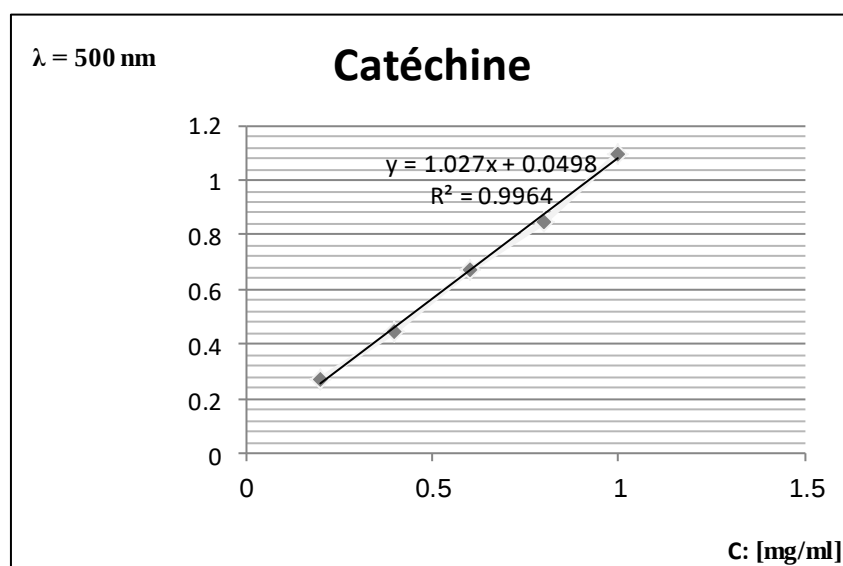


Figure 18. Courbe d'étalonnage de Catéchine pour le dosage des tanins condensés

4. Activité antioxydante

4.1. DPPH

4.1.1. Principe

Le radical connu le plus stable est le 2-2-diphényl 1-picryl-hydrazil (DPPH[•]) contrairement à d'autres radicaux libres, il ne peut pas être dimère en raison d'un enchevêtrement stérique autour de l'atome d'azote qui porte l'électron célibataire. Cependant, ce radical peut être réduit par le transfert d'hydrogène qui résulte des nombreux antioxydants présents dans l'environnement réactionnel.

La diminution de l'intensité de la couleur, qui est définie par spectrophotométrie à 517 nm, est causée par la réduction du DPPH (Molyneux, 2004).

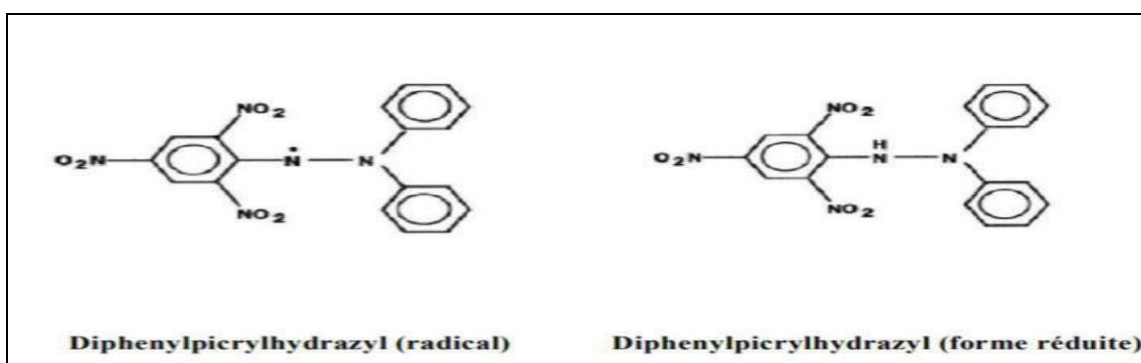


Figure 19. Transformation du radical DPPH[•] en DPPHH (Moon & Shibamoto, 2009).

4.1.2. Mode opératoire

Selon la méthode de (W. Brand-Williams et al.,1995). L'activité de piégeage des radicaux libres a été mesurée avec DPPH. 1 ml de différentes concentrations d'extraits a été mélangé avec 1 ml de méthanol contenant du DPPH (10^{-4} M) et incubé à l'obscurité pendant 15 min

L'absorbance a été mesurée à 517 nm avec un UV-Vis spectrophotomètre. Les étalons d'acide ascorbique étaient préparés pour une comparaison positive. Le pourcentage de l'inhibition a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$I \% = (A_c - A_s / A_c) \times 100$$

A_c = absorbance du contrôle ; A_s = absorbance de l'échantillon. Les valeurs IC₅₀ ont été calculées à partir de la courbe linéaire d'équation de l'activité de nettoyage par rapport à la concentration des échantillons. IC₅₀ est défini comme le total antioxydant nécessaire pour diminuer de 50% sans DPPH radical (Chouikh et al., 2018). Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de l'acide ascorbique. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de l'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g).

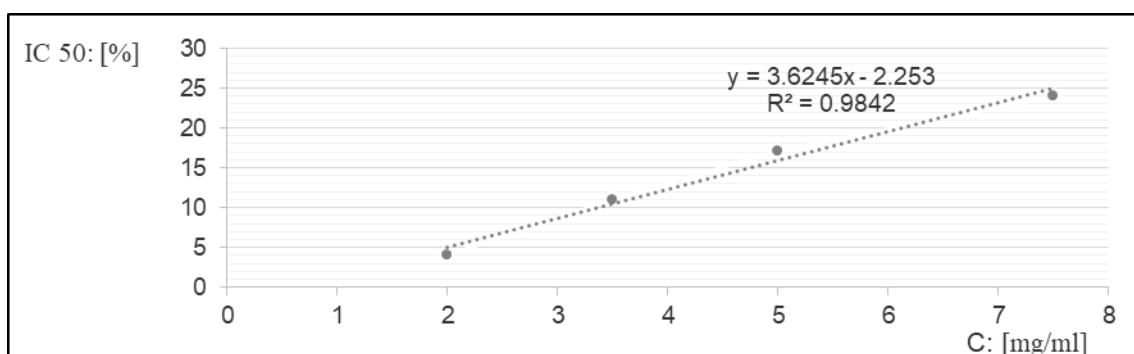


figure 20. Courbe des pourcentages d'inhibition du DPPH• pour l'acide ascorbique

4.2. FRAP

4.2.1. Principe

Grâce à cette méthode, la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) dans le complexe ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe^{2+}) est facilitée par la présence de réducteurs dans l'extrait de grenade. Le changement de couleur du fer ferrique de couleur jaune vers le fer ferreux de couleur vert indique la réaction. La spectrophotométrie à 700 nm est utilisée pour mesurer l'intensité de cette teinte (Bougandoura & Bendimerad, 2013)

4.2.2. Mode opératoire

Le protocole expérimental qui est suivi est-ce de (Karagözler et al.2008). Un millilitre de l'échantillon dilué à différents pourcentages dans l'eau distillée est mélangé avec 2,5 mL d'un Un tampon de solution de phosphate (0,2 M ; pH : 6,6) et 2,5 mL de $K_3Fe(CN)_6$ à 1 % sont ajoutés, et les tubes sont ensuite incubés à 50 °C pendant 20 min. Pour arrêter la réaction, 2,5 mL (TCA) à 10 % est ajouté lorsque les tubes ont refroidi à température ambiante. Pendant quelques minutes, les tubes sont centrifugés à 3000 tours / min. Nous mesurons 2,5 mL de surnageant et y ajoutons 2,5 mL d'eau de distillation. Ensuite, nous ajoutons 500 μ L de solution $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ à 0,1% fraîchement préparée au mélange. À l'aide d'un spectrophotomètre, les absorbances sont lues par rapport à un blanc à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de l'acide ascorbique. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de l'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g).

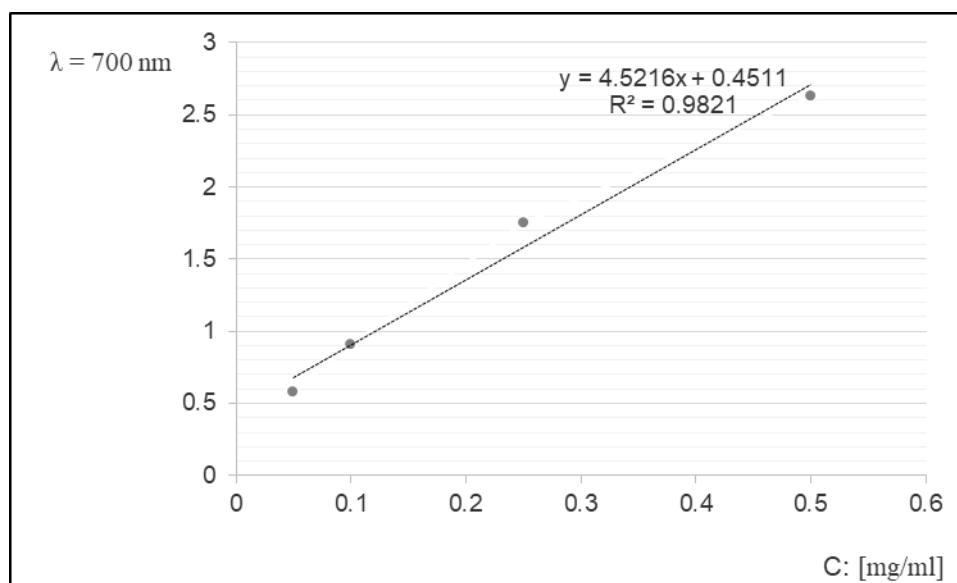


Figure 21. Courbe d'acide ascorbique utilisée pour déterminer la valeur EC0.5 dans le test FRAP.

4.3.β-carotène

4.3.1. Principe

Le test de blanchiment du β-carotène sert à mesurer l'inhibition des composés organiques volatils et des hydro-péroxydes conjugués diène provenant de l'oxydation d'acide linoléique pour évaluer l'activité antioxydante (**Dapkevicius et al., 1998**).

4.3.2 Mode opératoire

Le test β-carotène/acide linoléique a été réalisé en utilisant la méthode modifiée de (**Kelen &Bektas ,2008**) (en utilisant du Tween 80 au lieu du Tween 40). Deux mg de β-carotène ont été dissous dans un mL de chloroforme et la solution résultante a été ajoutée à un ballon contenant deux mg d'acide lactique et deux mg de Tween 80. Après l'évaporation du chloroforme à 40 °C, vigoureusement agitationvigoureuse. De cette solution fraîche, 2,5 ml est transféré dans un tube contenant 350 µl du produit à une concentration (0,5 mg / ml).

Ce système d'émulsion est incubé pendant 48 heures dans l'obscurité, avec la même fréquence de l'oxygénant synthétique néobutyl hydroxytol (BHT) à 0,5 mg/mL et tube en blanc

À partir de 490 nm, l'activité antioxydante relative (AAR) a été calculée selon la formule suivante:

$$\text{AAR (\%)} = (\text{A échantillon} / \text{A BHT}) \times 100$$

5.Activité antimicrobienne

5.1. Méthode de diffusion sur gélose (méthode par puits)

La méthode de diffusion des disques est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne. Dans cette méthode, les paramètres tels que le volume placé sur les disques depapier, l'épaisseur de la couche de gélose et si un dissolvant est employé varient considérablement entre les études (**Manou et al., 1998; Burt, 2004**). L'activité antimicrobienne d'extrait est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition (mm) autour des disques contenant l'extrait à tester contre les germes pathogènes après 24 h heures d'incubation à une température adéquate de 37°C. Cette méthode est réalisée selon le protocole décrit par (**Biondi et al.,1993**). Le principe de ce test repose sur la diffusion des agents antimicrobien de différentes concentrations en milieu solide. Après un certain temps de contact entre les composés antimicrobien et la souche, l'effet du produit antimicrobien appa-

rait comme une zone d'inhibition, la souche est considérée soit sensible, très sensible, extrêmement sensible ou bien résistante

5.2. Préparation du milieu de culture

Des boîtes de Pétri contenant de la gélose Sabouraud dextrose additionnée de glucose 2% (pour les Champignon) et de la gélose Mueller-Hinton (pour les bactéries) sont ensemencées aseptiquement avec une suspension à 10^6 cellules/ml obtenue à partir d'une petite culture de microorganismes.

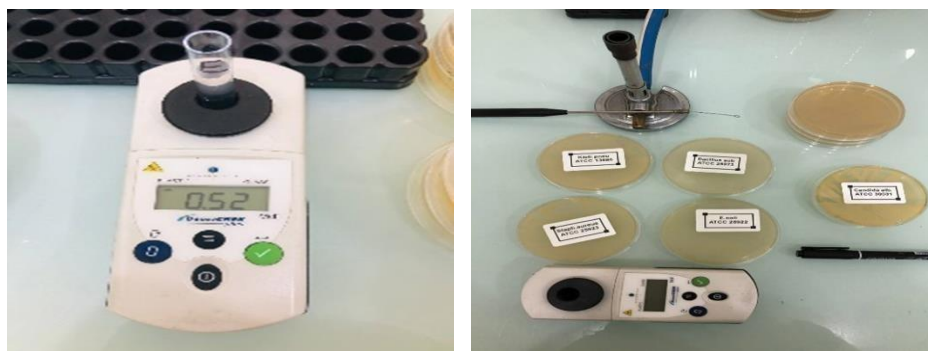


Figure 22.milieu de culture bactérie

5.3. Stérilisation du matériel

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes ont été stérilisés en premier à sec dans un autoclave, les disques en papier Wattman et la gélose nutritive a été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

5.4. Préparation des dilutions d'extraits des plantes

80 mg d'extrait d'écorce de grenade préalablement préparé ont été dissous dans 1 ml (DMSO) et les ingrédients ont été bien agités pour obtenir la solution mère.

5.5. Dilution de l'extrait d'écorce de grenade

Les solutions diluées sont préparées à partir de la solution mère et sont présentées ci- dessous S0: contient de la solution mère pure. S1: contient 500 μl de la solution mère et 500 μl du DMSO (dilution 1/2) S2: contient 500 μl de la solution S1 et 500 μl du DMSO (dilution 1/4). S3: contient 500 μl de la solution S2 et 500 μl du DMSO (dilution 1/8).

5.6. Ensemencement et dépôt des disques

Une fois les plaques sèches, percez la gélose au milieu à l'aide du haut d'une pipette Pasteur. Les cavités résultantes sont remplies de solutions aqueuses de l'extrait à des concentrations de (80, 40, 20 et 10 mg/mL) (environ 50 μL par puits). Les boîtes sont incubées dans un

incubateur à une température de 37 degrés Celsius pendant 48 heures pour les champignons et 24 Heures pour les bactéries

L'action inhibitrice est indiquée par la formation d'une zone d'inhibition autour des disques. Les résultats sont lus en mesurant les diamètres des zones d'inhibition. Un produit est considéré comme actif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 6 mm (**Kiehlbauch et al., 2000; Bonev et al., 2008**)

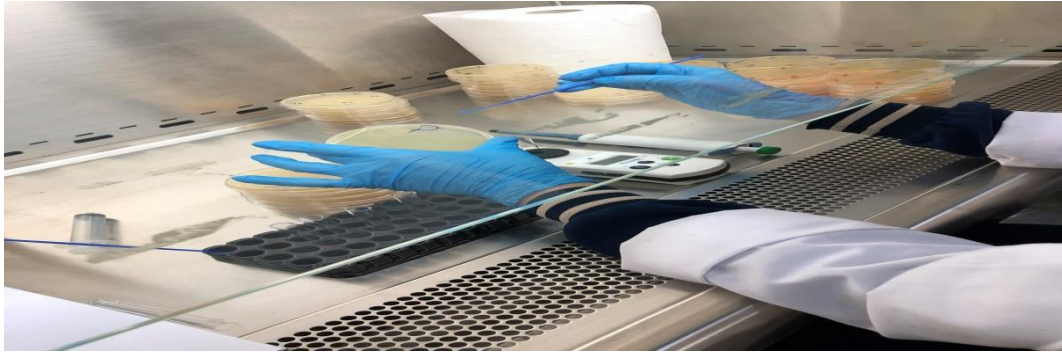


Figure 23. Remplissez les cavités résultantes avec des solutions aqueuses d'extrait d'écorce de grenade

5.7. Lecture

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibition au tour des disques. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (**Ponce et al., 2003**)

- ❖ **Non sensible (-) ou résistante** : diamètre moins de 8 mm.
- ❖ **Sensible (+)** : diamètre entre 9 à 14 mm.
- ❖ **Très sensible (++)** : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- ❖ **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre plus de 20 mm.

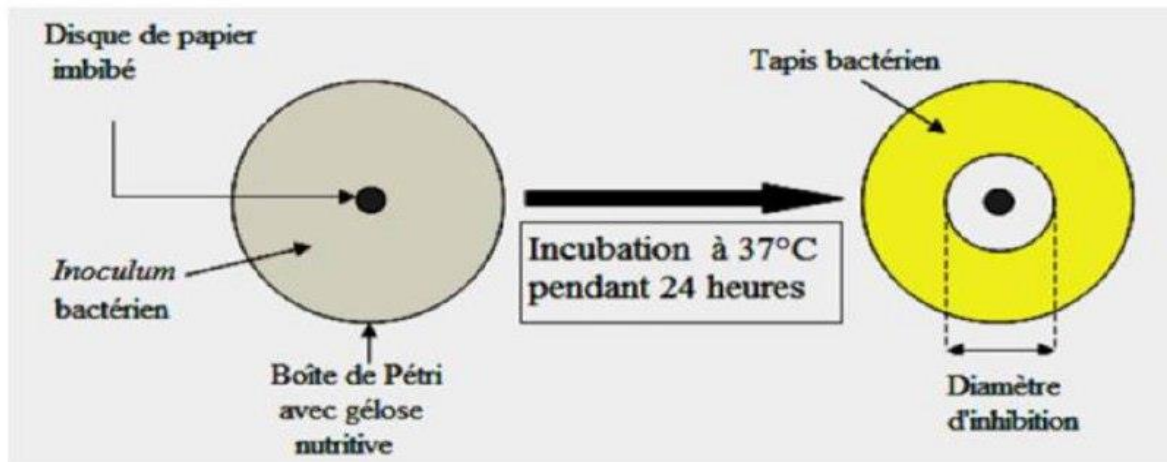


Figure 24.Principe de la méthode de diffusion en milieu gélosé (Reguieg., 2019)

In vivo

1. Tests anti-inflammatoires sur les souris

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de l'extrait aqueux de l'écore de grenade sur l'inflammation cutanée de la patte de souris induite par la carragénine à 1% comme modèle expérimental d'inflammation aiguë selon la méthode de (prekar et al.,2015).

Protocole expérimental: Les souris ont été réparties en cinq groupes:

- **Groupe 1:** Souris inflammées et traitées avec le médicament de Diclofénac sodium
 - **Groupe 2:** Souris inflammées et traitées avec l'extrait
 - **Groupe 3:** Souris inflammées et traitées avec de l'eau physiologique
 - **Groupe 4:** Témoin positif (sans inflammation)
 - **Groupe 5:** Souris non inflammées recevant l'extrait en alternance avec l'eau de boisson
- **Test du premier groupe**

Les souris de ce groupe ont été traitées avec un médicament préparé en dissolvant 50 mg de Diclofénac sodium dans 6 ml d'eau physiologique par gavage (voie orale) un volume équivalente à 1% du poids de chaque souris. Une heure après, 100ul de λ - carragénine ont été injectés à chaque souris et le périmètre de la patte a été surveillé régulièrement pendant 48 heures après l'injection.

• Test du deuxième groupe

Les souris de ce groupe ont été traitées avec l'extrait à raison de par souris par gavage (voie orale)une volume équivalente à 1% du poids de chaque souris. Une heure après, 100ul de λ - carragénine ont été injectés à chaquesouris et le périmètre de la patte a été surveillé régulièrement pendant 48 heures après l'injection.

• Test du troisième groupe

Les souris de ce groupe ont été gavage (voie orale) avec de l'eau physiologique de volume équivalente à 1% du poids de chaque souris. Une heure après, 100ul de λ - carragénine ont été injectés à chaque souris et le périmètre de la patte a été surveillé régulièrement pendant 48 heures après l'injection.

• Test du quatrième groupe

Ce groupe sert de témoin et n'a été traité ni avec l'extrait, ni avec le médicament, ni avec l'eau physiologique. Il n'a pas non plus été injecté de λ - carragénine.

• Test du cinquième groupe

Les souris de ce groupe ont été placées dans des conditions de vie spécifiques dans lesquelles leur eau de boisson a été remplacée par l'extrait aqueux préparé.

Groupe 1

Gavage (voie orale)
volume équivalente à 1%
du poids de chaque souris

Diclofénac sodium par
souris. Une heure après, 100
ul de λ - carragénine ont été
injectés à chaque souris



Groupe 2

Gavage (voie orale)
volume équivalente à 1%
du poids de chaque souris .

Une heure après, 100ul de
 λ - carragénine injectés à
chaque souris



Groupe 3

Gavage (voie orale)
volume équivalente à 1%
du poids de chaque souris
l'eau physiologique par
souris. Une heure
après, 100ul de λ -
carragénine ont été injectés
à chaque souris



Groupe 4

N'a été traité ni avec l'extrait,
ni avec le
médicament, ni avec l'eau
physiologique



Groupe 5

Des conditions de vie
spécifiques dans lesquelles
leur eau de boisson a été
remplacée par l'extrait
aqueux préparé.



Figure 25. protocole de etude anti- inflamamtoire sur les souris in vivo

2. Toxicité

La toxicité est une analyse quantitative et qualitative des changements qui se produisent dans les systèmes du corps après l'administration de la dose requise et son suivi pendant quelques minutes ou jours. Quatre souris de laboratoire (groupe cinq) ont été soumises à des conditions de vie particulières. Leur eau potable a été remplacée par un extrait de pelure de grenade à une dose de 200 mg/l. Elles ont alterné entre manger et jeûner pendant 10 jours (pendant cette période, les souris ont été observées et leurs données enregistrées) selon méthode (Azzi& Hamida.,2016)avec petit modifié.

2. Méthode de sacrifice

A la fin de l'expérience, les souris sont transférées au laboratoire d'abattage après une nuit complète de jeûne, où elles sont anesthésiées à la chlorofome et abattues au niveau du cou après stérilisation des outils et du lieu et prélèvement de sang et placés dans des tuyaux propres. Ils ont été centrifugés pendant 15 minutes à 3000 tr/min. Les échantillons de sérum sont conservés à -20 °C pour analyse chimique (FNS) et Crp.

3. Méthode de prélèvements sanguins

Le prélèvement du sang a été réalisé le matin à jeun. Le sang est recueilli dans des tubes à anticoagulants EDTA, héparinés, et citraté

- Le tube à EDTA a été utilisé pour le dosage des paramètres hématologiques et de stress érythrocytaire (FNS).

- Des tubes stériles ont été utilisés dans le test CRP

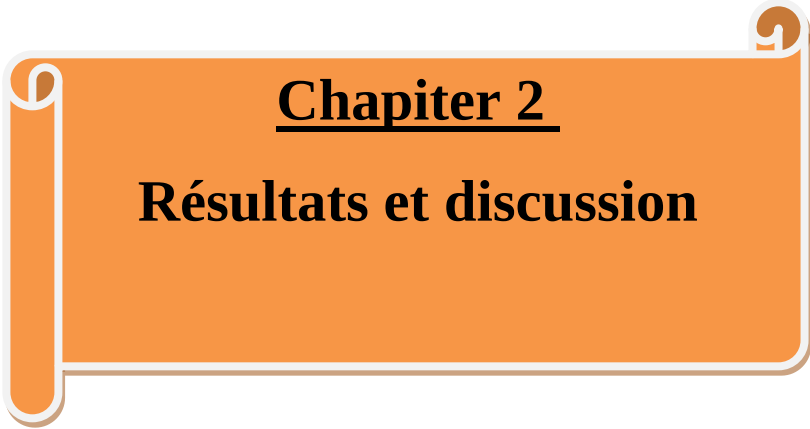
- Centrifugés pendant 10 minutes à 3000 tr/min. Les échantillons de sérum sont conservés à (-20°C).

- **Numération formule sanguine (FNS)** L'hémogramme est réalisé à l'aide d'un automate (mindray BC 31s) sur du sang total prélevé dans un tube contenant de l'EDTA. L'automate utilisé donne directement les paramètres hématologiques suivants (nombre de globules blancs/ μ l, nombre de globules rouges/ μ l, taux d'hémoglobine, taux d'hématocrite, nombre de plaquettes/ μ l, Volume globulaire moyen en hémoglobine, concentration globulaire moyen en hémoglobine). Ceci était suivi de l'établissement de la formule sanguine basée sur l'observation au microscope optique d'un frottis sanguin après coloration par le May Grunwald-Giemsa

✚ **La protéine C-réactive (CRP):** est une protéine produite par le foie (**Roubille et al., 2008**), et une augmentation des niveaux de cette protéine se produit généralement si le corps est exposé à différents types d'infections. Autrement dit, le test CRP est un test d'inflammation dans le corps. Sa demi- vie est de 6 à 8 heures. Sa valeur physiologique est inférieure à 10 mg/L. Sa concentration s'élève dès la 6ème heure de l'inflammation. En moyenne, elle devient pathologique 24 heures après le début de l'inflammation et se normalise rapidement après la disparition de la source de l'inflammation. Le retour de la CRP à une valeur physiologique permet de juger de l'efficacité du traitement.il faut effectuer un prélèvement de sang veineux sur anticoagulant EDTA, de sérum ou de sang capillaire, il est préférable d'être à jeun. L'unité de mesure est le mg/l (**Boghini, 2013**).

4. Étude statistique

Au moyen du logiciel Excel2010, les résultats ont été obtenus sous forme de moyenne et d'écart type. De plus, les résultats ont été représentés graphiquement (colonnes et courbes).

An orange scroll banner with a white border and decorative scroll ends on the left and right sides.

Chapiter 2

Résultats et discussion

In vitro**1. Détermination du rendement**

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux de 10 g des écorces de grenade *P. granatum*, cela représente un rendement de 44,9% de matière végétale sèche.

$$R = (4.49/10) \times 100$$

En général, le pourcentage de rendement est lié à la méthode d'extraction, au type de solvant et à la durée d'extraction, car en fonction de ces critères, la valeur du rendement obtenu peut varier. (Turkmen et al., 2006)

(Younes & Meftah., 2020) peut obtenir 29,9 % lorsqu'il est extrait avec de l'eau distillée, qui était la même méthode d'extraction que la méthode d'extraction utilisée dans notre étude (bouzaid., 2019) a obtenu 25,2 % parce qu'elle a utilisé la méthode sous agitation pendant 24 h sur un agitateur magnétique et lors du changement du solvant dans l'expérience (bouzaid., 2019) où il a remplacé l'eau distillée par du méthanol 70 % dans la même méthode d'extraction avec de l'eau distillée. L'extrait était de 50,2 %. Cette valeur est la preuve que le solvant joue un rôle important dans le ratio de rentabilité ainsi que dans le temps et la méthode. Bien que dans les deux études précédentes avec l'extrait aquatique, un bon résultat ait été donné, dans notre étude, la rentabilité était bien meilleure que celle de ces deux études précédente.

2. Teneurs des composés phénoliques

La teneur en composé phénolique a été déterminée par analyse quantitative par le spectrophotomètre de sorte que les résultats indiqués dans le tableau (tableau 6) montrent que l'extrait de l'écorce de grenade est riche en polyphénol de sorte que la teneur en polyphénol a été estimée à $40.422 \pm 0,042$ mg EAG/g Ex tandis que la teneur en flavonoïdes a été estimée 8.207 ± 0.29 mg EQ/g Ex, ainsi que le contenu de tanins 6.892 ± 0.291 mg EC/g Ex.

Tableau 6: Teneur en composés phénoliques de l'extrait des écorces de grenade

	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins
Quantité	40.422 ± 0.042	8.207 ± 0.29	6.892 ± 0.291
	mg EAG/g Ex	mg EQ/g Ex	mg EC/g Ex

On remarque que la quantité de polyphénols dans l'extrait aqueux des écorces de grenade est faible par rapport à d'autres études, qu'elles soient réalisées avec de l'eau ou des solvants organiques. Parmi les résultats d'études antérieures, on peut citer : l'étude de **Rajan (2011)**: Polyphénols : 176.00 ± 5.29 mg EAG/g , Flavonoïdes : 81.33 ± 6.1 mg EQ/g et Tanins : 114.23 ± 12.16 mg EC/g et aussi l'étude de **Douaouri (2018)**: Polyphénols : 227.92 ± 92.60 mg EAG/g , Flavonoïdes : 31.34 ± 0.26 et 21.67 ± 0.09 mg EQ/g et Tanins : 214.28 ± 1.79 mg EC/g

En comparant notre étude avec les deux études citées ci-dessus, nos résultats sont faibles par rapport à celles-ci. D'autre part, l'étude de **Bachiri et Benziane (2022)** a ajouté une proportion de méthanol à l'eau (hydro-éthanolique) et a obtenu les résultats suivants: Polyphénols: $152, 53 \pm 3, 04$ mg EAG/g de MS , Flavonoïdes: $46,249 \pm 2, 83$ mg EQ/g MS et Tanins: $374, 4 \pm 2, 75$ mg EAT/g MS De même, l'étude de **d'Abderrezak (2016)** a confirmé que le méthanol donnait les meilleurs résultats: Polyphénols: 472.46 ± 2.39 mg EAG/g de MS , Flavonoïdes: 32.6 ± 1.46 mg EQ/g MS et Tanins: 3.99 ± 0.32 mg EAT/g MS

Ces résultats indiquent que les écorces de grenade extraites au méthanol donnent un rendement plus élevé que celles extraites à l'eau. Cela est attribué à la différence de polarité entre les solvants et donc à la solubilité du soluté dans le solvant. En outre, l'efficacité du méthanol dans l'extraction de divers composés phénoliques à partir de différentes parties de plantes a été démontrée par plusieurs études (**Turkmen et al., 2006; Mohamed et al., 2013; Rabita et Franzina, 2013; Ali et al., 2014; El-Din et al., 2014**).

3. Activité antioxydante

Les écores de grenade sont une source extrêmement riche en antioxydants. C'est pourquoi des tests d'antioxydation ont été réalisés sur l'extrait aqueux de pelures de grenade en utilisant les méthodes DPPH, FRAP et bêta-carotène. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7

L'activité antioxydante de nos extrait (dans le test DPPH) est exprimée en IC₅₀ , paramètre défini comme la concentration efficace du substrat qui provoque une perte de 50% de l'activité DPPH. Ces IC₅₀ ont été déterminées graphiquement, l'abscisse représentant la concentration de l'extrait et l'ordonnée représentant l'activité antioxydant en pourcentage. des fins comparatives, l'acide ascorbique a été utilisé comme un antioxydant standard, il a montré une activité anti-radicalaire très puissante avec IC₅₀ de 0.014 ± 0.001 mg/ml, tandis que l'activité antioxydant de notre extrait est de l'ordre de 0.031 ± 0.001 mg/ml (**tableau7**). Plus la valeur de

l'IC₅₀ est faible, plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant. Nous notons que la valeur obtenue par notre extrait est moins importante que celle de l'acide ascorbique.

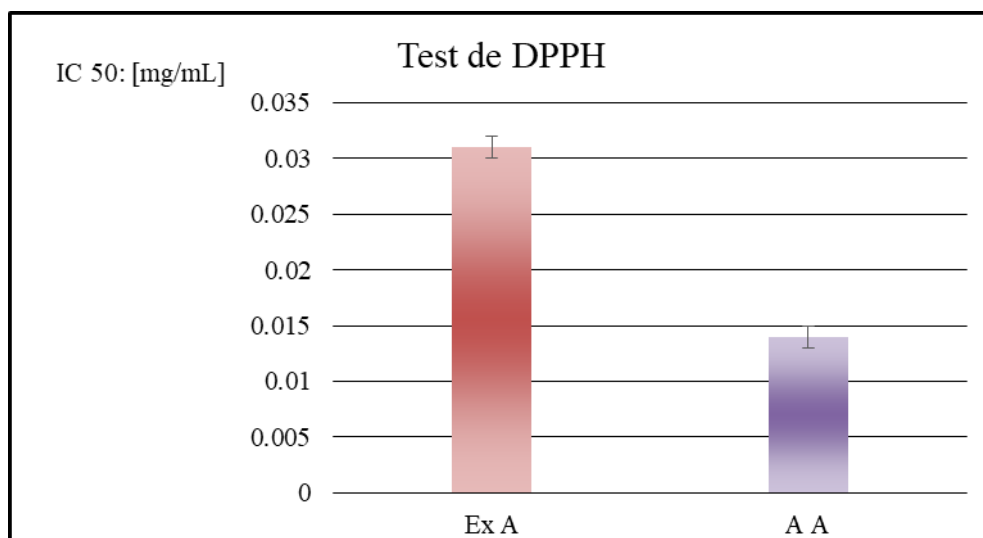


Figure 26. Résultats des IC₅₀ du radical DPPH de l'extrait de plante et de l'acide ascorbique.

Le test FRAP traite les antioxydants présents dans l'échantillon comme des agents réducteurs Dans la réaction d'oxydation et de réduction chromatique. (Huang et al., 2012). Nous pouvons exprimer le pouvoir réducteur d'extrait et de l'antioxydant de référence par la valeur par laquelle un extrait atteint la valeur 0.5 de l'absorbance. Cette valeur peut être appelée la CE_{0.5} (Concentration efficace).

La force de réduction du composé est un indicateur important de son activité antioxydante Potentiel (Depa et al., 2009 ; Kanat et al., 2010 ; Cheng et al., 2011) À des fins comparatives, l'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant standard, A montré une très forte activité anti-radicalaire avec EC₅₀ = 0,015±0,006 mg/ml, tandis que L'activité antioxydante de notre extrait est de l'ordre d'EC₅₀ = 0.977 ± 0,007mg/ml (tableau7). Notez que la valeur obtenue par notre extrait est moins importante que la valeur de l'acide Ascorbique **Figure 27**

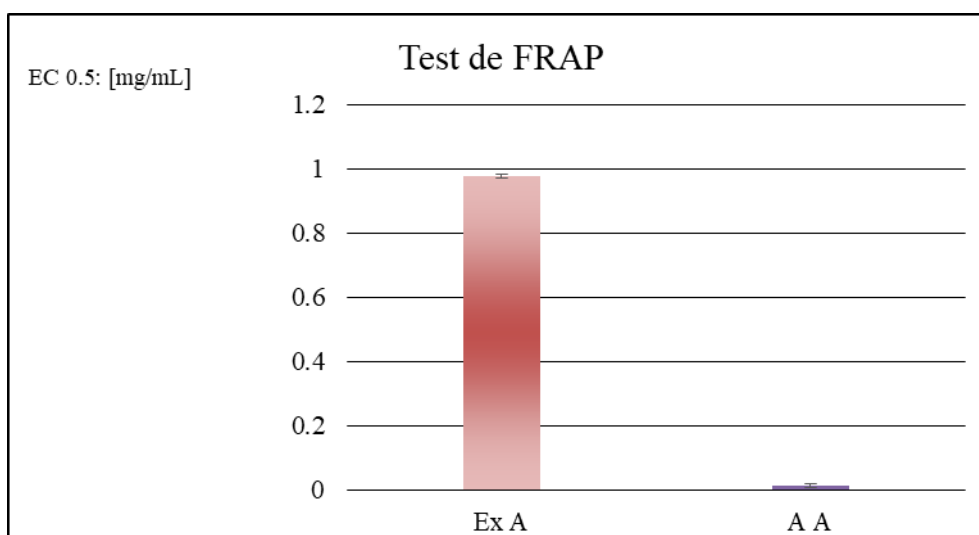


Figure 28. Résultats des EC0.5 du test FRAP de l'extrait de plante et de l'acide ascorbique

Afin de connaître l'activité de la bêta de carotène dans l'écore de grenade. Une étude a été menée sur un extrait aqueux de pelures de grenade ainsi que sur sa comparaison avec le BHT, nous avons donc obtenu des résultats représentés dans la **figure 29**

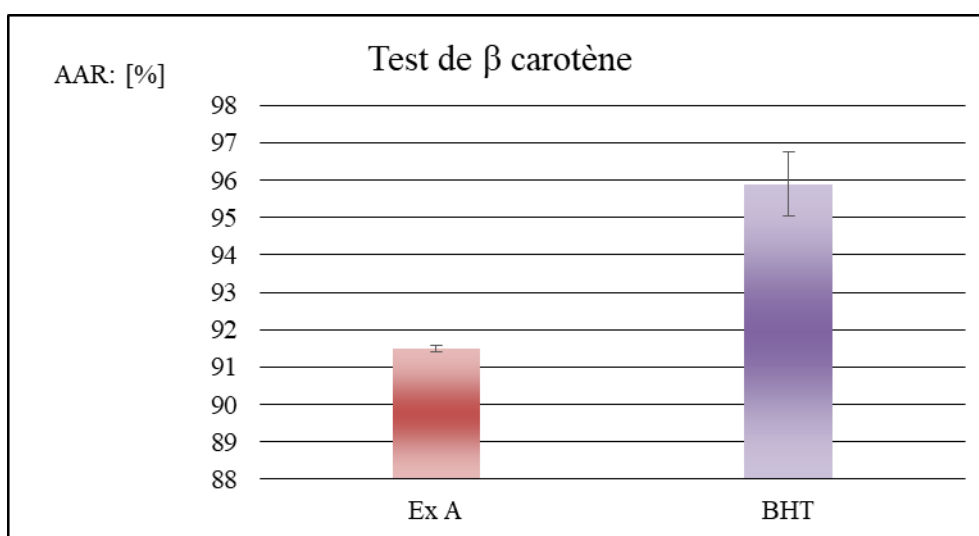


Figure 30. Résultats des AAR (%) du β carotène de l'extrait de plante et de BHT

L'activité antioxydante dans les extraits dépend des additifs Extraits de racines avec des radicaux libres d'acide linoléique. Les radicaux libres de La linolite attaque les modèles de bêta-carotène insaturé. Présence de divers antioxydants Il peut endommager l'importance du blanchiment du β- carotène en neutralisant les radicaux libres de Linolite et autres radicaux libres formés dans le système (**Jayaprakasha et al., 2001**). L'extrait aquatique des écores de grenade a fourni un taux d'inhibition d'environ (91,495±0,74 %) et rapport aux résultats du BHT, la valeur est plus élevée, car le taux d'inhibition de (95,888±0.855 %) (**tableau7**)

Tableau 7: Activité antioxydant de l'extrait aqueux des écores des grenade

	L'extrait	Les standards
DPPH [IC₅₀: mg/mL]	0.031± 0.001	0,014±0,001
FRAP [EC_{0,5}: mg/mL]	0.977± 0.007	0,015±0,006
β-carotène [AAR: %]	91.495± 0.074	95,888±0,855

Nos résultats ont révélé que l'extrait d'écorce de grenade a une forte capacité inhibitrice efficace contre les radicaux libres (DPPH) où il a été estimé à 0.031± 0.001 mg/mL par rapport au test FRAP, il a été considéré comme il a été estimé à 0.977± 0.007 mg/ml. Alors que le test de b-carotane a donné un excellent résultat estimé à 91.495± 0.074%

D'autres études, comme celles de **Rajan et al. (2011)** et **Manasathin et al. (2012)**, ont trouvé des valeurs IC₅₀ élevées pour les extraits aqueux de pelures de grenade de différentes variétés, de l'ordre de 0,135 ± 39,30 mg/ml et 0,151 ± 2,70 mg/ml. **Singh et al. (2014)** ont conclu que l'extraction sélective d'antioxydants à partir de sources naturelles à l'aide d'un solvant approprié est très importante pour obtenir des extraits ayant une activité antioxydante élevée. Il est clair que notre extrait a une capacité de réduction modérée. Cette contradiction peut s'expliquer par la différence des composés phénoliques présents dans notre extrait. La capacité de réduction de notre extrait est due à la présence de polyphénols. Les antioxydants peuvent être considérés comme des agents réducteurs et des inhibiteurs d'oxydation

Huang et Prior et al. (2005) ont établi une relation entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante de certains extraits. Cette relation établie une corrélation linéaire entre les composés phénoliques et la capacité antioxydante qui s'explique par un transfert d'électrons. Le pouvoir réducteur des écorces de la grenade est plus élevé par rapport à celui de la pulpe et les graines, qui est dû à la richesse de celle-ci en flavonoides, et en polyphenols totaux (**Singh et al., 2002**).

Antioxydant de l'extrait aqueux des écores de grenade nos valeurs sont plus élevées que l'extrait aqueux et de méthanol de **Douaouri.,2018** et la valeur de CE₅₀ a été trouvée respectivement 0.211±0.009mg/ml, 0.173±0.010 mgml L'écorce de grenade méthanolique et aqueuse montre un certain degré d'efficacité Le réducteur cependant.

Différences dans la capacité antioxydante des extraits de méthanol Les différences dans leur teneur phénolique (**Jill et al., 2000**) peuvent être attribuées à l'action antioxydante de ces réductions qui dépend de la perturbation des chaînes des radicaux libres. En faisant don de

graines d'hydrogène et en la convertissant ainsi en espèces plus non réactives Stabile. Les réductions réagissent avec certains précurseurs de peroxyde, empêchant ainsi l'apparition de La composition en peroxyde (**Huang et Prior, 2005**) fait référence à l'effet réduit des extraits de grenade Cela semble être dû à la présence de polyphénols qui peuvent fonctionner de manière similaire. Réduction par don d'électrons.

Nos résultats était plus élevé que

Douaouri, 2018, où ils ont constaté que les extraits organiques fournissaient des réponses différentes à la couleur de la décoloration du β -carotène. Par extrait de méthanol avec un taux d'inhibition d'environ $89,58 \pm 2,09$ %. Alors Que l'extrait aqueux avait un effet antioxydant plutôt faible ($77,78 \pm 1,20$ %).

L'étude actuelle a prouvé que l'ensemble du fruit de *P. granatum* est une riche source d'antioxydants nutritionnels, comme le confirme notre étude grâce au pourcentage élevé de cet extrait. Grâce à des études précédentes sur l'extrait de pelures de grenade, qu'elles soient aqueuses ou au méthanol, et notre étude a montré que les écorces de grenade sont considérées comme l'un des fruits très riches en antioxydants, ce qui leur permet de préserver leurs filles et de les protéger des dommages.

3.Activité antimicrobienne

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antimicrobien d'extrait de Pelure de grenade par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, Mueller- Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la champignon. L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de cinq germes pathogènes qui sont : *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. Subtilis* et *C. albicans*. Le DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes. Les souches testées ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards utilisés: Gentamicine. (**tableau8**)montre les résultats obtenus

Tableau8:Résultats de tests antimicrobienne

Les souches utilisées	Microbial inhibition				CN
	10mg/ml	20mg/ml	40mg/	80mg/	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NI	NI	NI	NI	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NI	NI	NI	7	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	NI	NI	8	13	23
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 25973	NI	NI	NI	8	15
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	NI	NI	NI	NI	/

NI = Non Inhibition, CN = Gentamicine (CN) 30ug Discs.

Il est remarquable que les concentrations de 10 et 20 mg/ml n'aient montré aucun effet sur aucun des Races. D'un autre côté concentrations de 40 et 80 mg/ml ont montré des effets inhibiteurs variables. C'est-à-dire que, selon les résultats obtenus lors de l'étude sur les cinq types de bactéries dans le **tableau8** et dans différentes concentrations, nous notons dans la bactérie *E. coli* ATCC 25922 qu'il n'y a pas de réponse à l'effet de l'extrait, contrairement à sa grande réponse à gentamicine, qui était jusqu'à (25 mm) pour la zone d'inhibition, et cela indique que ces bactéries ont pu résister à l'extrait aqueux des croûtes de grenade, tandis que la bactérie *P. aeruginosa* ATCC 27853, nous notons que la bactérie n'ont pas résisté à la concentration 80 mg/ml concentration seulement et au rapport d'inhibition (7 mm) sur le reste des concentrations, la bactérie a résisté à l'extrait aqueux des coquilles de grenade, et l'absence de résistance l'inhibition était 24 mm plus élevée) Comme dans la bactérie *S. aureus* ATCC 25932, nous observons une résistance à deux concentrations et aucune résistance aux concentrations suivantes 40 et 80 mg/ml, qui étaient le diamètre de la zone d'inhibition (13 et 8 mm) respectivement, et bien qu'il y ait eu des zones d'inhibition pour un extrait aqueux de pelures de grenade, l'efficacité de la gentomacine était plus élevée que dans ces bactéries dans la zone d'inhibition estimée (23 mm). Lors du test de souche de *B. subtilis* ATCC 25973, nous avons également observé que l'absence de comparaison de l'extrait de écore de grenade n'était qu'à une concentration de 80 mg/ml, ce qui a entraîné une zone d'inhibition de (8 mm). Aucune zone d'inhibition n'a été produite dans le reste des concentrations. Lorsque la gentamine a été appliquée sur les mêmes bactéries, il a été observé que la distance de la zone d'inhibition, qui est (15 mm), est plus élevée que celle de l'extrait de pelures de grenade.

Quant à *C. albicans* ATCC 10231, elle est résistante aux concentrations d'extrait aqueux des écores de grenade.L'extrait aqueux de la grenade a montré une certaine activité antimicro-

bienne contre certains types de bactéries. La souche *S. aureus* ATCC 25932 était la plus sensible à l'extrait. Cependant, la souche de *C. albicans* était la plus résistante à l'extrait

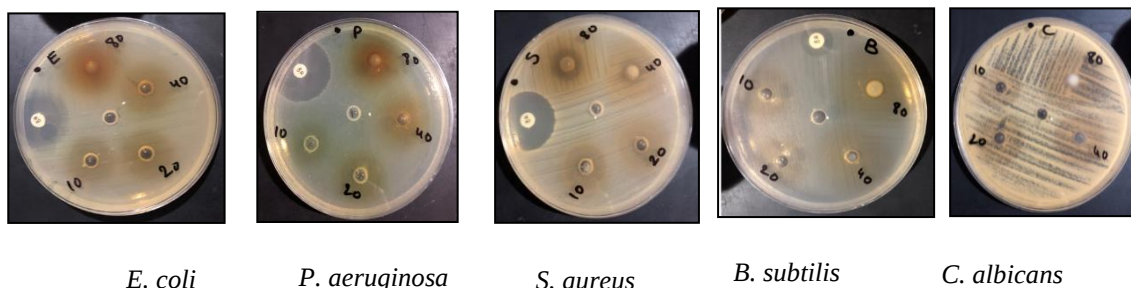


Figure 31. Zones d'inhibition de l'extrait aqueux d'écorces de grenade chez les bactéries

L'extrait de écore de grenade n'a pas d'activité antibactérienne contre *E. coli* ni antifongique contre les souches de levure testées. Ces résultats sont cohérents avec ceux de **Singh et al. (2002)** **Abdureyim et al., (2011)** Qui a rapporté que l'extrait de croûtes *P. granatum* n'a aucun effet sur *C. albicans* une étude (**Salah.,2018**) a démontré que lorsque de faibles concentrations, certaines souches présentent un faible effet inhibiteur par opposition aux concentrations élevées de l'extrait qui montrent un effet inhibiteur sur le *S. aureus*, le *B.subtilis* et le *P. aeruginosa*. Ce sont des résultats qui sont cohérents avec nos résultats. Selon **le tableau8**. Selon la mesure citée par **Mina, Sethi (1994)** et **Ella et al. (1996)**, Les résultats obtenus peuvent être interprétés comme suit : Activité inhibitrice modérée sur *S. aureus* et *P. aeruginosa* activité légèrement inhibitrice sur *B. subtilis* activité non inhibitrice contre *E. coli* et souches de champignon de *C. albicans*.

In vivo

Les écores de grenade sont utilisées comme alternative médicale à l'anti-inflammatoire, de sorte qu'un essai a été mené sur 20 souris et leur a injecté une substance qui provoque l'inflammation et les a traités avec diverses solutions, y compris l'extrait écores de grenade, les résultats de l'injection ont été obtenus dans le tableau suivant :

Tableau 9: Effet du extrait aqueux des écores de grenade sur volume l'œdème induit chez les rats par l'injection de la caragénine.

	Volume (mm) de l'œdème					
	0 h	1 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Médicament	1.95±0.129	2.625±0.150	2.95±0.173	2.6±0.163	2.325±0.126	2.025±0.17
Extrait	1.85±0.1	2.65±0.129	2.95±0.153	2.65±0.141	2.375±0.173	1.925±0.15
Contrôle	2.275±0.171	3.275±0.208	3.775±0.1	3.425±0.15	2.975±0.126	2.375±0.17

Au cours de l'expérience et pendant les premières heures de l'injection de carragénine, des d'une réponse inflammatoire caractérisée par les cinq signes de base connus : gonflement, rougeur, chaleur, perte de fonction et hypersensibilité locale. Parmi les symptômes apparents figurent la rougeur, les ballonnements et l'incapacité de marcher avec cette jambe, comme le montre **figure 32**



Avant injection

Après injection

Figure 33. Effet de la caragénine sur la cuisse des souris

Lors de l'observation périodique pendant 48 heures du volume de l'œdème (nm) chez des souris traitées avec du diclofénac sodium, ainsi que chez des souris traitées avec l'extrait aqueux de croûtes de grenade et le groupe exempté (complètement sain), les résultats indiqués dans le tableau ont été obtenus. La taille de l'œdème gonflement pour la jambe du rat a été surveillée à six fois différentes (0 heure, 1 heure, 4 heures, 8 heures, 24 heures, 48 heures). Grâce aux résultats enregistrés dans le tableau et obtenus, ils peuvent être divisés en 4 Phases :

La première phases: Lors de l'injection de caragénine directement (0 heures) : Nous notons que le volume moyen dans le groupe traité avec le médicament ($1,95 \pm 0,129$) L'extrait ($1,85 \pm 0,1$) est inférieur au volume tumoral au contrôle du groupe ($2,275 \pm 0,171$)

La deuxième phase: Pendant les premières heures d'injection et de traitement (1 heure à 4 heures), de sorte qu'une augmentation de la taille de la jambe (tumeur) a été observée de sorte que le groupe de traitement médicamenteux a atteint un maximum de ($2,95 \pm 0,173$) comme pour le groupe Le traitement avec l'extrait a atteint un maximum de ($2,95 \pm 0,153$), tandis que le maximum était dans le groupe témoin ($3,775 \pm 0,1$) Si la caragénine provoque réellement une réaction inflammatoire qui provoque un œdème. Ces résultats sont cohérents avec le travail de **Chu et al. (2011)** Où la taille de l'œdème Après l'injection, la carraghénane augmente au fil du temps jusqu'à ce qu'elle atteigne son niveau Le maximum

La troisième phase : à (8 heures), le début de la diminution de la taille de l'œdème, où dans le groupe traité avec le médicament atteint ($2,6 \pm 0,163$) et dans le groupe traité avec de l'extrait à ($2,65 \pm 0,141$), tandis que le groupe a atteint le contrôle ($3,425 \pm 0,15$)

Le quatrième phase (24 heures - 48 heures) diminue davantage de la taille de l'œdème au fil du temps pour atteindre $2,025 \pm 0,171$ dans le groupe de traitement médicamenteux et $1,925 \pm 0,15$ Dans le groupe traité avec l'extrait ainsi que $2,375 \pm 0,171$

48 heures après l'injection et le traitement On peut dire que l'extrait fait presque la même chose que l'extrait en cas d'inflammation pour réduire sa gravité et réduire la quantité de douleur. Afin d'approfondir davantage les résultats, ils ont été formés sous la forme de ratios d'inhibition (%) par

➤ Calcul du pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG)

Le pourcentage d'augmentation (%AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris. Il est donné par la formule suivante (**Douaouri .,2018**)

$$\%AUG = \frac{(D_n - D_0) \times 100}{D_0}$$

D_n : diamètre de la patte la i^{ème} heure après l'injection de la carragénine.

D₀ : diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine.

➤ **Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH)**

Le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante (Douaouri .,2018)

$$\% \text{ INH} = \frac{\% \text{AUG témoin} - \% \text{AUG traité}}{\% \text{AUG témoin}} \times 100$$

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau10: Effet du extrait aqueux des écores de grenade sur pourcentage d'inhibition (%) de l'œdème induit chez les rats par l'injection de la caragénine.

	Pourcentage d'inhibition (%) de l'œdème					
	0 h	1 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Médicament	0	19.853±1.544	21.867±2.479	24.107±2.759	21.809±3.86	14.777±2.592
Extrait	0	19.072±0.783	21.849±0.645	22.612±2.384	20.196±2.85	18.955±2.134
Contrôle	--	--	--	--	--	--

Grâce aux résultats obtenus, nous notons que l'efficacité du médicament dans la réduction de l'inflammation au cours des premières 24 heures $21,809 \pm 3,868$ a été plus efficace que l'extrait $20.196 \pm 2,859$. Cependant, après cette période, l'efficacité du médicament pour inhiber l'inflammation a diminué à $14,777 \pm 2592$. L'efficacité de l'extrait a diminué de $18,955 \pm 2,134$, cependant, l'efficacité de l'extrait était supérieure à l'efficacité du médicament dans les 48 heures suivant l'injection et le traitement.

Malgré la réponse rapide au médicament, l'effet de l'extrait est meilleur pour réduire l'inflammation parce que l'effet de ce médicament est temporaire, mais l'extrait est capable d'éliminer complètement l'inflammation, mais pour une période illimitée.

Alors que la toxicité de l'extrait a été testée sur des souris, qui ont reçu une dose de 200 mg / litre, et il a été assuré que l'extrait est non toxique et ne cause aucun effet secondaire sur le corps, de sorte que les souris n'ont pas changé ni leur comportement ni leur masse, et n'ont pas non plus conduit à leur mort.

Des études menées par **Baiju et al. (2015)** ont révélé que l'extrait méthanolique de grenade possède une capacité remarquable à inhiber la formation d'œdèmes. Ces résultats rejoignent ceux d'autres recherches qui attribuent l'activité anti-inflammatoire de la grenade à sa richesse en composés polyphénoliques, tels que les tanins hydrolysables et les flavonoïdes (**Zarfeshany et al., 2014**). Ces composés, reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, sont largement présents dans les plantes. En effet, certains flavonoïdes ont démontré une action inhibitrice efficace dans divers modèles d'inflammation animale, notamment l'œdème de la patte, l'œdème de l'oreille et la pleurésie (**Kim et al., 2017**).

De plus, de nombreuses études suggèrent que les parties végétales riches en tanins, flavonoïdes et acides phénoliques présentent des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires chez les animaux expérimentaux (**Mills et Bone, 2000; Morteza-Semnani et al., 2006**). Ces effets pharmacologiques sont attribués à la présence de ces composés bioactifs. L'étude phytochimique réalisée dans ce contexte a confirmé la présence de plusieurs composés bioactifs dans l'extrait d'écorces de grenade, ce qui renforce l'hypothèse de son activité anti-inflammatoire.

L'inflammation se propage dans le sang par plusieurs mécanismes, dont le plus important est le flux lymphatique, dans lequel les vaisseaux lymphatiques transportent les cellules inflammatoires du site de l'inflammation vers d'autres parties du corps, et la circulation sanguine, qui permet aux cellules inflammatoires de pénétrer dans la circulation sanguine. Les

vaisseaux sanguins dilatés dans la zone affectée. Ainsi, une série d'analyses ont été réalisées, à savoir : FNS (WBC, RBC, HGB, PLT) ainsi que CRP pour cinq groupes de souris (traitées avec Médicament, Extrait, Control, (Témoin, Toxicité Les résultats obtenus sont consignés

dans le **tableau 11**

Tableau11: Résultats des analyses chimique de sang

	WBC	RBC	HGB	PLT ($10^3/uL$)	CRP
Médicament	8.7±1.783	6.325±1.197	11.833±1.274	1043.5±20.825	0.133±0.066
Extrait	8.425±1.846	6.9±0.081	11.813±0.375	1224.25±62.480	0.453±0.042
Contrôle	9.5±1.152	6.37±0.369	11.2±0.577	1121±33.506	0.933±0.046
Témoin	5.8±0.707	5.565±1.082	9.25±1.485	1158.5±74.246	0.865±0.064
Toxicité	5.1±0.624	6.537±0.288	10.4±0.624	859.333±20.008	0.34±0.062
Normale	4~11	3,8~5,4	10~15,5	150~450	0~5

D'après les résultats du blog dans le tableau, nous notons que :

- **Le nombre de globules blancs** :à Témoin était de ($5,8 \pm 0,707$), ce qui se situe dans la plage normale pour le nombre de globules sanguins à 4~11. De même, dans le groupe toxicsite, contrôle, médicament et extrait, les valeurs étaient tous dans la plage normale. Cela prouve qu'il existe une réponse immunitaire contre l'inflammation en raison de la présence d'une quantité de globules blancs capables de réduire l'inflammation et sa gravité, les globules blancs jouent un rôle important dans la lutte contre l'infection et la régulation la réponse immunitaire.
- **Le nombre de globules rouges** :à $5,565 \pm 1,082$ était dans la plage La normale est d'environ 3,8~5,4 Quant au groupe traité avec le médicament, l'extrait, le contrôle et la toxicité, le nombre de cellules sanguines était supérieur à la normale. Cela indique que l'inflammation n'affecte pas les globules rouges.
- **L'hémoglobine** : tous les groupes se situait dans la plage normale de 10~15,5, bien que le groupe témoin ait connu une très légère diminution de $9,25 \pm 1,485$.
- **Plaquettes** : On remarque une augmentation significative du nombre de plaquettes pour l'ensemble du groupe, même le groupe témoin, en dehors de sa fourchette normale de

150~450. L'inflammation stimule le corps à produire plus de plaquettes pour aider le corps à combattre l'infection et à réparer les tissus endommagés.

Certaines protéines inflammatoires peuvent augmenter la durée de vie des plaquettes et empêcher leur dégradation. Donc Un taux élevé de plaquettes peut être le signe d'une inflammation dans le corps.

- **Les valeurs CRP:** pour les cinq groupes se situent dans la plage normale de 0~5

En général les résultats des analyses de sang n'indiquent aucune inflammation grave dans aucun des cinq groupes. Plaquettes élevées : cela peut indiquer une inflammation, mais ce n'est pas un indicateur concluant car il existe de nombreuses autres causes d'une numération plaquettaire élevée. On ne peut donc pas dire que le sang contient une inflammation.

En 2002, **Singh et al. (2002)** ont extrait des composés phénoliques de la peau, du corps et de la pulpe du fruit de la grenade en utilisant du méthanol, de l'acétone et de l'eau; ils ont trouvé que le méthanol donnait le meilleur rendement. Le méthanol est généralement recommandé comme meilleur solvant pour l'extraction des composés antioxydants en raison de sa polarité et de sa disponibilité. L'efficacité et la capacité du méthanol peuvent être augmentées en utilisant l'eau comme solvant auxiliaire, en particulier lors de l'extraction d'antioxydants à partir de matrices complexes. De plus, l'utilisation de différents types d'eau (deionisée, distillée, etc.) peut influencer l'extraction (**Iqbal et al., 2005**).

En général, les composés phénoliques dans les plantes sont des composés polaires, qui sont souvent extraits à l'aide de solvants polaires tels que l'acétone aqueuse et le méthanol. Cependant, les profils phénoliques peuvent également varier en fonction des solvants utilisés (**Kylli, 2010**). **Hagir et al. (2016)** ont révélé la présence flavonoïdes et tanins dans l'extraits de l'écorce du fruit de *P. granatum* aqueux.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Bhandary et al. (2012)**; **Hegde et al. (2012)**; **Uma et al. (2012)**; **Shabibi et Al-Falali (2013)**; **Moorthy et al. (2013)**; **Narasimha Reddy et al. (2015)**. **Ozkal et Dink (1994)** ont confirmé que les flavonoïdes et les tanins sont les composés les plus abondants dans l'écorce de cette plante. La grenade est connue pour être l'un des fruits les plus riches en polyphénols. En particulier, l'écorce du fruit contient des quantités élevées de composés phénoliques, tels que les acides puniques, galliques et ellagiques et les anthocyanines (**Bingham et al., 2003**; **Fischer et al., 2011**). Des études ont rapporté que la teneur en phénols des écorces de grenade était 10 fois plus élevée (249,4 mg/g) que celle de la pulpe (24,4 mg/g) (**Li et al., 2006**).



Conclusion

Le lien des gens avec la nature existe depuis l'Antiquité est la raison de l'héritage de l'utilisation des plantes comme source de traitement. C'est pourquoi notre étude a mis en lumière les écorces du fruit de la grenade, ainsi que la connaissance du contenu de certains composés phénoliques. est l'objectif principal de l'étude, la connaissance d'un extrait qui contient des antioxydants, des antimicrobiens et des anti-inflammatoires, car les grenades ont été utilisées sur le marché local de l'état de Wadi Souf, d'où le rendement de notre étude sur l'eau l'extrait d'écorces de grenade était de 44,9%, ce qui représente un bon pourcentage de rendement. Ce rendement se traduit par une teneur en polyphénols $40,422 \pm 0,042$ mg EAG/gEx, flavanoïdes $8,207 \pm 0,29$ mg EQ/g Ex et tanins condensés 6.892 ± 0.291 mg EC/g Ex. Ainsi, les écorces de grenade sont riches en polyphénols par rapport aux flavanoïdes et aux tanins condensés.

Alors que l'extrait aqueux d'écorces de grenade a donné une forte capacité antioxydante dans le test DDPH, qui a été estimée 0.031 ± 0.001 mg/mL par rapport au Frap, qui a été estimé à 0.977 ± 0.007 mg/mL. En revanche, le test B carotane a grandement préservé la couleur de l'extrait de $91.495 \pm 0.074\%$, la valeur du test DPPH étant la meilleure par rapport aux résultats du reste des tests.

En sélectionnant cinq tranches de microbienne et en plaçant l'extrait par disques d'étalement dans un milieu gélosé, l'extrait a donné des zones d'inhibition pour certains types de bactéries à des concentrations de 40 et 80 mg/ml, dont les diamètres variaient de 7 à 13 pour chacune des bactéries. *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *B. subtilis*.

Bien que la toxicité de l'extrait ait été testée sur des souris ayant reçu une dose de 200 mg/litre, il a été confirmé que l'extrait n'est pas toxique et ne provoque aucun effet secondaire sur l'organisme, de sorte que les souris n'ont pas changé non plus. leur comportement ou leur masse, et cela n'a pas entraîné leur mort. L'effet anti-inflammatoire de celui-ci a également été déterminé en traitant des souris présentant une tumeur au niveau de la patte avec l'extrait aqueux et en surveillant la taille de la tumeur pendant 48 heures. après traitement, on remarque que la taille de la l'oedème diminue avec le temps pendant les premières 48 heures de traitement, et cela est confirmé par des analyses biochimiques du sang de souris infectées par FNS et Crp, indiquant que l'extrait a éliminé l'inflammation parce qu'il l'a fait n'atteint pas le sang.

Au terme de ce travail, et à travers les résultats obtenus, on peut affirmer que les écorces de grenade ont un effet antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire efficace.

Conclusion

Nos résultats sont merveilleux et peuvent avoir de grandes perspectives dans le futur. Compte tenu de l'utilité des écorces de grenade, les chercheurs, les médecins et les pharmaciens peuvent prendre en compte l'étude et la développer davantage pour l'utiliser comme source alternative de médecine synthétique ou même l'utiliser comme matériau de base dans la fabrication de médicaments.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ✓ **Abdullahzadeh et al. (2011):** "Effet de l'extrait de l'écorce de grenade (*Punica granatum* L.) sur certains champignons cutanés pathogènes." *Revue de recherche en biologie médicale*, 12(2), 117-122
- ✓ **Abdureyim S., Amat N., Umar A., Upur H., Berke B., Moore N., 2011.** Anti-inflammatory, immunomodulatory, and heme oxygenase-1 inhibitory activities of ravan napas, a formulation of uighur traditional medicine, in a rat model of allergic asthma. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol 2011, pp. 13.
- ✓ **Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., et Sestili, P. (2015).** Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food chemistry*, 174, 417-425.
- ✓ **Aleh, 2018:** "Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'écorce de grenade (*Punica granatum*) contre les bactéries et les champignons pathogènes." *Revue des sciences pharmaceutiques et médicales*, 51(1), 1-6
- ✓ **Ali s.i., el-baz f.k., el-etary g.a., khan e.a., mohamed a.a., 2014.** HPLC- analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol 6, no 4, p. 348-55
- ✓ **Alia F., Chouikh A., Djahra A. B., Bousbia Brahim A., Nani S., et Tliba A., (2021)** Comparative study of some physiochemical and biological properties of effect host species variation on the relationship Saharan parasitic plant *Cistanche violaceae* (Dessf.) Beck. *Notulae Scientia Biologica*, 13 (4): 1-17.
- ✓ **Amjad H. (2005).** POMEGRANATE : Anatomy Of A Divine Remedy. éd Lulu.com, 126 p, ISBN : 1411662784 .
- ✓ **ANGELOS M.G., KUTALAV.K., TORRES C.A., HE G., STONER J.D., MOHAMMED M., KUPPUSAMY P.(2005).** Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290(1): 341-347. doi: 10.1152/ajpheart.00223.2005
- ✓ **AZZI Manel et HAMIDA Abir.** "Effet de l'extrait aqueux de *Phragmites australis* (1841) chez les rats diabétiques Wistar albinos." Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences Biologiques, spécialité Biochimie Appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire. Année universitaire **2015/2016**

Références bibliographiques

- ✓ **Bachiri, Naoual, et Benziane, Youssra. 2021/2022.** Etude phytochimique et valorisation de l'écorce de *Punica granatum* L. récolté de la région de M'sila, en produit d'hygiène bucco-dentaire. Mémoire de Master Académique, Université Mohamed Boudiaf - M'sila
- ✓ **Baiju E.C., Jeslin T., Padikkala J., 2015.** Free radical scavenging and anti-inflammatory activities of *Punica granatum* Linn. Fruit rind. *Research & Reviews: Journal of Biology*, vol 3, no 4, p. 12-15
- ✓ **Barouki, R., Morel, Y.(2001).**Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol* , 61(5) : 511-516. doi: 10.1016/s0006-2952(00)00543- 8
- ✓ **Benkhaled, A. (2018).** Activités anti-inflammatoire, anti-oxydante et antimicrobienne de l'extrait aqueux de *Limoniastrum guyonianum*. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
- ✓ **Bhandary, S. K., Bhat, V. S., & Sherigara, B. S. (2012).** Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant activity of pomegranate peel extract. *Journal of Food Science and Technology*, 49(4), 423-428.
- ✓ **Bhattacharya S. (2015).** Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. *Free Radicals in Human Health and Disease*, 18 :17–29. I:10.1007/978-81-322-2035-0_2
- ✓ **Bingham S. A., Day N.E., Luben, R., 2003.** Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European prospective investigation into cancer nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, vol 361, p.1496-1501
- ✓ **Biondi, S., Bagni, N., & Torrigiani, P. (1993).** Polyamines and morphogenesis in normal and transgenic plant cultures. *In vitro cellular and developmental biology - Plant*, 29(4), 404-411.
- ✓ **Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012).** Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9- 19. doi:10.1097/wox.0b013e3182439613
- ✓ **Bonev, B., J. Hooper,** and J. Parisot, Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2008. 61(6): p. 1295-1301.
- ✓ **Borghini, A. (2013).** CRP (C-reactive protein). *Revue médicale suisse*, 89(1478), 1201-1204
- ✓ **Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante desextraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. B, 6.

Références bibliographiques

- ✓ **Bouزيد, A. (2019).** Screening phytochimique et activités biologiques des extraits d'écorces et de membranes de la grenade (*Punica granatum* L.) (Mémoire de Master en Sciences de la Nature et de la Vie, Spécialité : Biochimie Appliquée). Université de Ghardaia, Algérie
- ✓ **Burt, S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. [enligne]. (2004),** vol. 94, p.223-253. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680>
- ✓ **Çam M., Hisil Y. et Durmaz G. (2009).** Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112 : 721– 726
- ✓ **Chahnez, S. (2013).** Effet de l'irradiation sur les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes & cryoprotectrices de l'écorce de *punica granatum*.
- ✓ **Chaplin D.D., 2010.** Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol 125, no 2, p. S3-S23.
- ✓ **Chebaibi A, Filali FR., 2013.** Bactericidal activity and phytochemical screening of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel aqueous extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol 7, no 14, p. 887-891. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.988>
- ✓ **Cheng, H., Zhang, H., Zhang, L., Liu, F., Wang, H., & Zhao, W. (2011).** Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. *Journal of Food Biochemistry*, 35(3), 791-805.
- ✓ **Chouikh A, Rebiai A (2020b).** The influence of extraction method on the composition and analgesic activity of *Calligonum comosum* phenolic extracts. *Ovidius University Annals of Chemistry* 31(1):33-37.
- ✓ **Chouikh A., Alia F., Neffar S., Rebiai A., Adjal E., et Chefrou A., (2018):** Evaluation of phenolic contents (quantitative et qualitative) et antioxidant activities in different physiological phases of *Genista saharae* COSS. & DUR. Growing in th sahara of algeria. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, 2: 84
- ✓ **Chu, Y.-H., et al. (2011).** Anti-inflammatory and analgesic activity of extracts from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-8.
- ✓ **Da Silva E.Z., Jamur M.C., Oliver C., 2014.** Mast cell function: a new vision of an old cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol 62, no 10, p. 698–738. Doi: <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
- ✓ **Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (EDS), Paris, p. 317

Références bibliographiques

- ✓ **Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linssen PH. 1998.** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 77: 140 - 146.
- ✓ **Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont- Rousselot D., 2005-** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Édition : Technique et documentation Lavoisier. Paris. 548p
- ✓ **Depa, S., Aggarwal, M., Kumar, S., Sharma, M., & Patil, R. D. (2009).** Evaluation of antioxidant potential of *Helicteres isora* Linn. fruits. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 8(1), 33-37.
- ✓ **Derouiche ,S., Zebidi ,M., Seghiri, I., Mehellou ,Z.(2018).** Evaluation of in-vitro Antioxidant and Anti-diabetic activities of leave aqueous extracts of *Oudneya Africana*. *World J Pharm Sci*; 6(5): 48-53.
- ✓ **Diallo, I. (2020).** Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture. 201
- ✓ **Douaouri N.E., 2018.** Contribution à une étude phytothérapeutique, anti-inflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum* L.). Thèse de Doctorat. Mostaganem. 203 pages.
- ✓ **Duyckaerts, C., Fouret, P., et Jacques-Hauw, J. (2002).** Chapitre 13 : l'inflammation. Cours Anatomie Pathologique PCEM2, Université Paris VI, faculté de médecine Pierre et Marie Curie, 2003, 60-98.
- ✓ **Edeas M. (2010).** Polyphénols et jus de grenade. *Phytothérapie*, 8 (1), 16-20 .
- ✓ **El Barnossi, F.** Moussaid, A. Iraqi Housseini Tangerine, banana, and pomegranate peels valorization for a sustainable environment: A review *Biotechnology Reports*, 29 (2021), e00574, 10.1016/j.btre.2020.e00574
- ✓ **El-Din, M. N., et al. (2014).** Antioxidant and antimicrobial activities of pomegranate peel extract prepared using different extraction techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 576
- ✓ **Ella, John.** "Effet inhibiteur des extraits sur *Bacillus X* et *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal de Biologie Moléculaire*, vol. 20, no. 2, **1996**, pp. 112-125.
- ✓ **Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez- Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. Redox Biol. 2015 Dec;6:183-197. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.008. Epub 2015 Jul 21. PMID: 26233704; PMCID: PMC4534574.**

Références bibliographiques

- ✓ **Favier A., 2003-** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Clinique*, novembre-décembre : 108-115.
- ✓ **Fawole O.A., Opara U.L** Harvest discrimination of pomegranate fruit: Postharvest quality changes and relationships between instrumental and sensory attributes during shelf life *Journal of Food Science*, 78 (8) (2013), 10.1111/1750-3841.12176
- ✓ **Fiset M.É., Gilbert C., Poubelle P.E., Pouliot M., 2003.** Human neutrophils as a source of nociceptin: a novel link between pain and inflammation. *Biochemistry*, vol 42, no 35, p. 10498-10505. Doi : 10.1021/bi0300635 .Reactive oxygen species, 2(4) :19-29. 10.20455/ros.2016.847 347 . doi: 10.1152/ajpheart.00223.2005
- ✓ **Frenzel L., Hermine O., 2013.** Mast cells and inflammation. *Joint Bone Spine*, vol 80, no 2, p. 141-145. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.08.013>
- ✓ **Ghodaro OM, Akinloye OA. (2017).** First line defence antioxidants- superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4) : 1-7
- ✓ **Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R.(2005).** Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole 2005*; 554- 558
- ✓ **Halliwell B., 1990-** How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research-Communications*, 9(1) : 1-32.
- ✓ **Hegde CR, Madhuri M, Swaroop T, Nishitha D, Arijit L, Bhattacharya S, Rohit KC. 2012.** Evaluation of antimicrobial properties, phytochemical contents and antioxidant capacities of leaf extracts of *Punica granatum* L. *ISCA, Journal of Biological Sciences* vol 1, no 2, p. 32-37.
- ✓ **Holland D., Hatib, K., Bar-Ya'akov,I., Janick, J., Pomegranate: Botany, horticulture, breeding Horticultural Reviews, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA (2009),** pp. 127-191, 10.1002/9780470593776.ch2
- ✓ **Huang D., Ou B., et Prior R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays.*J. Agric. Food Chem*,53: 1841–1856 doi:10.1021/jf030723c.
- ✓ **Huang S.Q., Ding S.D., Fan L.P., 2012.** Antioxidant activities of five polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol 50, p.1183–1187
- ✓ **Kanat, O., Cubukcu, B., Kaya, A., & Yesil-Celiktas, O. (2010).** Antioxidant capacity of Syrian Oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) fruit extracted with various solvents. *Journal of Food Biochemistry*, 34(2), 314-331

Références bibliographiques

- ✓ **Karagözler A., Erdag C.S., Çalmaz Emek Y., (2008).**Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111 : pp400- 407.
- ✓ **Kelen M, Bektas T. 2008.** Chemical composition, antioxydant and antimicrobial properties of essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioressources technology*, 99: 4096-4104
- ✓ **Kiehlbauch, J.A., et al.,** Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories. *Journal of clinical microbiology*, **2000**. 38(9): p. 3341-3348.
- ✓ **KimH.P.,LimH.,KwonY.S.,2017.**Therapeuticpotentialofmedicinalplantsandtheir constituents on lung inflammatory disorders. *Biomolecules and Therapeutics*, vol 25, no 2, p. 91–104. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.187>
- ✓ **Kohen R. and Nyska A. (2002).** Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.* 2002; 30: 620-650.
- ✓ **Krishnamurthy, P., Wadhvani, A. (2012).** Antioxidant Enzymes and Human Health, 412.
- ✓ **Krystel-Whittemore M., Dileepan K.N., Wood J.G., 2016.** Mast cell: a multi- functional master cell. *Frontiers in immunology*, vol 6, p. 620.
- ✓ **Kumar, S. (2011).** Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research*, 2(1), 129-135. Available online at www.pelagiaresearchlibrary.com
- ✓ **Kylli, P., 2010.** Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties
- ✓ **Lansky E., Shubert S. et Neeman I. (2000).** Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. In : Melgarejo-Moreno P. (ed.), Martínez-Nicolás J.J. (ed.), Martínez-Tomé J. (ed.) *Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology*, Zaragoza : CIHEAM- IAMZ, 2000. 253 p. ISBN 2- 85352-214-8.
- ✓ **Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J., Cheng S., 2006.** Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, vol 96, p. 254–260
- ✓ **Lu J., Holmgren A., 2014.** The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, vol 66, p. 75-87. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>

Références bibliographiques

- ✓ **Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Domenico Bonaduce D, Abete P. (2018).** 0 and diseases. Clinical Interventions in Aging. (13) :757-772.
- ✓ **Ma, W. G., Tanr, X., Fuzzati, N., Li. Q. S., Wolfender, J. L. and Hostettmann, K. (1997).** Natural occurring and synthetic polyynes glycosides. Phytochemistry, 45(2): 411-415 .
- ✓ **Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer M-J. and Barel A-O. Evaluation of the preservative properties of Thymus vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test. [en ligne]. (1998),** vol. 84, n°3 p. 368-376. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721641>
- ✓ **Medzhitov R., 2008.** Origin and physiological roles of inflammation. Nature, vol 454, no 7203, pp. 428- 435
- ✓ **Mills S., Bone K., 2000.** Principles and Practice of Phytotherapy, 1st ed. Churchill Livingstone, Edinburgh
- ✓ **Mina et Sethi (1994):** "Activité antifongique des tanins de l'écorce de Terminalia chebula." Journal of Ethnopharmacology, 43(2), 113-118. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003194221730047X>
- ✓ **Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.M., Zujko, M.E. (2018).**Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Advances in Medical Sciences, 63(1): 68-78. doi: 10.1016/j.advms.2017.05.005
- ✓ **Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK., 2013.** Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of Syzygium cumini leaves. PLoS One, vol 8, no 4, p.e60269.
- ✓ **Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) forestimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal Science Technology, 27 : 152-159.
- ✓ **Moon J.K. et Shibamoto T., 2009-** Antioxidant assays for plant and food components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(5) : 1655-1666
- ✓ **Moorthy K., Punitha T., Vinodhini R., Sureshkumar B.T., Vijayalakshmi P., Thajuddin N., 2013.** Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of Punica granatum Linn. (PERICARP). Journal of Medicinal Plants Research, vol 7, no 9, p. 474-479.
- ✓ **Morteza-Semnani K., Mahmoudi M., Heidar M.R., 2006.** Analgesic activity of the methanol extract and total alkaloids of Glaucium paucilobum. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, vol 28, p.151–155.

Références bibliographiques

- ✓ **MOUFFOUK, C. (2019).** Evaluation des activités biologiques et étude de la composition chimique de la plante *Scabiosa stellata* L. 237
- ✓ **Murthy, H. N., Dijkstra, C., & Anthony, P. (2013).** Effect of various extraction methods on concentration and composition of phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *Separation Science and Technology*, 48(9), 1415-1420.
- ✓ **Muster, D. (2005)** .Médicaments de l'inflammation. Edition Elsevier Paris. 21-29
- ✓ **Narasimha M. K., Fazilath U., Soumya K., Srinivas C., 2015.** Antibacterial activity and phytochemical screening of aqueous and methanolic extracts of pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel against bacterial wilt of tomato. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, vol 3, no 6, p. 1786-1792.
- ✓ **Nathan C., 2006.** Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews immunology*, vol 6, no 3, p. 173-182. Doi : 10.1038/nri1785
- ✓ **Noack M, Kolopp-Sarda MN. (2018).** Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Rev Fr Lab*, 489 (3), 28- 37.
- ✓ **Novelli G. P. Role of free radicals in septic shock. J.(1997).** *Physiol. Pharmacol.* 1997; 48: 517-527
- ✓ **Ozkal, N, Dinc S., 1994.** Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum* L.) peels from the standpoint of pharmacy. *Ankara University Eczacilik Fak Derg*, vol 22, p.21-29.
- ✓ **Padmaja, A., et Prasad, N. B. L. (2011).** Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract as a source of natural antioxidant. *Journal of Food Science and Engineering*, 1(3), 171
- ✓ **Patrice Magnard.(2014).** Laréaction inflammatoire aiguë. Copyright.
- ✓ **Pham-Huy, L.A., He, H. & Pham-Huy, Ch. (2008).** Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of Biomedical science*, 4 (2), 89-96.
- ✓ **PINCEMAIL J., CILLARD J., NEVE J. et DEFRAIGNE J.O., 2014-**Mesure de la capacité antioxydante globale du plasma : une revue critique. *Annales de biologie clinique*. 72(4) : 413- 421.
- ✓ **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E. & Roura S.I., 2003-** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36: 679
- ✓ **Prekar., Belgave, S.S., Rege, N.N. (2015).** Experimental evaluation of analgesic, anti-inflammatory and anti-platelet potential of dashamoola. *J Ayurveda Inter.Med.* Jan-Mar, 6(1), p: 8-11.

Références bibliographiques

- ✓ **Rabeta MS, Nur Faraniza R., 2013.** Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *International Food and Research Journal*, vol 20, no 4, p.1691-1696.
- ✓ **Rahmani, A. H., Alsahli, M. A., et Almatroodi, S. A. (2017).** Active constituents of pomegranates (*Punica granatum*) as potential candidates in the management of health through modulation of biological activities. *Pharmacognosy Journal*, 9(5).
- ✓ **Rajan, S., Mahalakshmi, S., Deepa, V. M., Sathiya, K., Shajitha, S., & Thiruganasambandari, T. (2011).** ANTIOXIDANT POTENTIALS OF PUNICA GRANATUM FRUIT RIND EXTRACTS: Revue de la littérature. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 82-88.
- ✓ **Reguieg M. (2019)** L'effet de *Punica granatum* sur la flore Gastrique ; Etude in vitro et in vivo chez le rat. Thèse de doctorat option phytothérapie et santé, Université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem, 119p
- ✓ **Roubille F., Cayla G., Picot M-C., Pradet V., Massin F., Gervasoni R., Pasquie J- L., Macia J-C., Piot C. & Leclercq F. (2008).** Intérêt de la C-reactive protein (CRP) dans l'évaluation pronostique de l'infarctus du myocarde revascularisé. *La Revue de médecine interne*, 29 : 868-874.
- ✓ **Rousselet, M. C., Vignaud, J. M., Hofman, P., et Chatelet, F. P. (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire. *Association française des enseignants et chercheurs en anatomie pathologie*, 1-57.
- ✓ **Ruis A.R., 2015.** Pomegranate and the mediation of balance in early medicine. *Critical Food Studies*. 15: 22-33.
- ✓ **Saleh, 2018:** "Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'écorce de grenade (*Punica granatum*) contre les bactéries et les champignons pathogènes." *Revue des sciences pharmaceutiques et médicales*, 51(1), 1-6
- ✓ **Santo, A., Zhu, H., Y. Robert, L.Y. (2016).** Free Radicals: From Health to Disease
- ✓ **SCHOFIELD P., MBUGUA D.M. et PELL A.N., 2001-**Analyses of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91 : 21-40. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology* 28 (1995) 25-30.
- ✓ **Seeram, N. P., & Schulman, R. N. (2006).** Pomegranate juice and its components as potential therapeutic agents for human health: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4317-4329.

Références bibliographiques

- ✓ **Sellal, A. H. (2009).** Activités antioxydant et anti-inflammatoire des extraits Aqueux et éthanolique du gingembre. Mémoire de Magister en biologie Spécialité : Biochimie et physiologie expérimentale. Université SETIF. 3
- ✓ **Sethi, Mina.** "Activité inhibitrice modérée de certaines souches sur Staphylococcus aureus." Journal of Microbiology, vol. 12, no. 3, 1994, pp. 45-58.
- ✓ **Sherwood E.R., Toliver-kinsky T., 2004.** Mechanisms of the inflammatory response. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, vol 18, no 3, p. 385- 405. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2003.12.002>
- ✓ **Shiban, M. S., Al-Otaibi, M. M., et Al-Zoreky, N. S. (2012).** Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. Food and Nutrition Sciences, 3(07), 991 • Greenwell, M., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Medicinal Plants : Their Use in Anticancer Treatment. International journal of pharmaceutical sciences and research, 6(10), 4103-4112 .
- ✓ **Singh R.P., Murthy C., Jayaprakasha G.K., (2002).** Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extract using in vitro models. J. Agric. Food Chem, 50,:81–86.
- ✓ **Smith R. E., 2014.** Pomegranate: Botany, Postharvest Treatment, Biochemical Composition and Health Effects. Nova Science Publisher. 97: 1-173
- ✓ **Trabsa, H. (2015).** Activité antioxydantes et anti-inflammatoire des fractions des plantes :sedumsediforme et lyciumarabicum .Thèse de doctorat en sciences Spécialité : Biochimie. Université ferhetabbassétif 1.19
- ✓ **Turkmen N, Sari F, Velioglu YS., 2006.** Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry, vol 99, p. 838-841.
- ✓ **Uma, K. R., Kuppan, P., Sankaranarayanan, R., & Ramanathan, S. (2012).** Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Punica granatum* peel extract. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4(4), 304-307.
- ✓ **VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J.(2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. vol. 39(1) : 44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- ✓ **vanier, Jean. (2005).** L'homme et la femme les créa. Paris: Éditions Desclée de Brouwer

Références bibliographiques

- ✓ **W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset,** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology* 28 **(1995)** 25-30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- ✓ **Willemse France. (2023).** Grenadier à fruits Fina Tendral.
<https://www.willemsefrance.fr/products/grenadier-a-fruits-fina-tendral>
- ✓ **Younes, I., & Meftahi, C. (2020).** Étude de l'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits d'écorce du fruit de grenadier "*Punica granatum*" d'Ain Témouchent sur la stabilité membranaire du globule rouge (Mémoire de Master en sciences biologiques, Option : Biochimie). Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent, Algérie.
- ✓ **Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH., 2014.** Potent health effects of pomegranate. *Advanced Biomedical Research*, vol 3, pp. 100. Doi: <http://dx.doi.org/10.4103/2277-9175.129371>
- ✓ **Zhao G.R., Xiang Z.J., Ye T.Y., Yuan Y.J., Guo Z.X., 2007.** Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chemistry*, vol 99, no 4, p. 767- 774
- ✓ **Zhao, L., & Zhang B. (2017).** Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Scientific Reports*, 1-11.
- ✓ **Żukowski, P., Maciejczyk, M., Waszkiel, D. (2018).** Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 92: 8–17.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.04.018>