



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère d'enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR –EL-OUED
FACULTE DE LA TECHNOLOGIE

Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE

Domaine: Sciences et Technologies

Filière: Génie des Procédés

Spécialité: Génie chimique

Présentée par: ZATOUN Saida & GHANEM Kenza

Thème

***Etude quantitative et activité antioxydante du
Punica granatum***

Soutenu le 27/05/2017

Mr CHAABIA Nacer	MAA	Président	Université d'El-Oued
Mme MENACEUR Souhila	MAA	Examineur	Université d'El-Oued
Mme BOUBEKRI Chérifa	MCA	Rapporteur	Université d'El-Oued

Année universitaire : 2016 - 2017

REMERCIEMENTS



Remerciements

*Avant tout, nous remercions le **BON DIEU** Tout Puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.*

*Ce travail à été réalisé au sein du Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes de l'université d'El-Oued, sous la direction de **Monsieur le professeur LANEZ Touhami**, que nous tenons à le remercier profondément.*

*Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à notre enseignante et encadreur **Mme BOUBEKRI Chérifa** pour sa disponibilité, son sérieux et ses conseils judicieux.*

*Nos remerciements vont également aux membres de jury **Mr CHAABIA Nacer** et **Mme MENACEUR Souhila** pour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche.*

*Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent aussi à **Melle BERRA Djamila**, **Melle Belloule Karima** et **Mme HEMMAMI Hadia** qui nous ont accompagné au cours de cette recherche, pour leur attention de tout instant sur nos travaux, pour leurs conseils avisés et leur écoute qui a été prépondérante pour la bonne réussite de ce travail.*

Sans oublier tous les ingénieurs du Laboratoire pédagogique.

On remercie également tous nos amis et collègues de la promotion de GP 2016/2017

Enfin, on tient à exprimer nos gratitude éternelle à nos familles tous par leur nom, pour leur patience et leur soutien illimité au cours de nos années scolaires dans les moments difficiles.

Saida & Kenza

RÉSUMÉ ملخص



Résumé:

Dans ce travail de recherche nous avons étudié le fruit de *Punica granatum* de la région de Taghzout (El Oued) : nous avons fait la quantification de la composition chimique totale, ainsi que l'étude de l'activité antioxydante totale, par la méthode chimique et la méthode électrochimique. On a préparé trois types d'échantillonnages : fruit entier, écorces et graines.

Tout d'abord, on a fait le dosage colorimétrique des polyphénols totaux dans tous les échantillons, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, la quantification a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, la quantification des flavonoïdes totaux a été effectuée en utilisant le réactif de trichlorure d'aluminium et la soude, et enfin la quantification des flavanols totaux a été réalisée aussi.

Les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer que les extraits de l'écorce ont été les plus riches et ont montré une activité antioxydante intéressante par rapport aux autres extraits.

Mots clés: *Punica granatum* , polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, flavanols , activité antioxydante.

ملخص:

في عمل البحث هذا قمنا بدراسة ثمرة الرمان (*Punica granatum*) لمنطقة تغزوت بالوادي: لقد قمنا بالتقدير الكمي للتركيبية الكيميائية الإجمالية وكذلك دراسة الفعالية المضادة للأكسدة بطريقتين : طريقة كيميائية و أخرى كهرو كيميائية ، حضرنا ثلاث أنواع من العينات: ثمرة كاملة ، قشور واللب.

قمنا أولاً بإجراء التقدير الكمي اللوني لـ لبوليفينولات الكلية بواسطة اختبار فولين- سيوكالتو بالاستعانة بجهاز المطيافية للأشعة فوق البنفسجية والمرئية ، التقدير الكمي للفلافونويدات الكلية والفلافانولات الكلية تم بطريقة استعمل فيها ثلاثي كلور الألمنيوم والصودا .

أكدت لنا نتائج هذه الأبحاث بأن مستخلصات القشور هي المستخلصات الأكثر غنى بالمركبات الفينولية والتي تملك فعالية عالية مضادة للأكسدة مقارنة بمستخلصات العينات الأخرى المدروسة.

الكلمات الدالة : الرمان، البوليفينولات الكلية، الفلافونيدات الكلية، الفلافانولات الكلية ، الفعالية المضادة للأكسدة.

Liste des abréviations

Abbreviation	Designation
EAG	Equivalent d'acide gallique
ER	Equivalent de rutine
EQ	Equivalent de quercétine
Rdt	Rendement d'extraction
UV- visible	Spectrophotométrie ultra violette
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
IC ₅₀	Concentration d'inhibition qui correspond à 50% de DPPH perdu
C.V	Voltampérométrie cyclique
AAT	Activité antioxydante totale
E _T	Electrode de travail
E _A	Electrode auxiliaire
A	Absorbance
Mo	Molybdène
W	Tungstène
O	Oxygène
H	Hydrogène
P	Phosphore
K	Potassium

Liste des figures

Chapitre I : Généralités

Figure (I.1): feuilles, fleurs et fruits de Punicagranatum	6
Figure (I.2): Fleurs et fruits du Grenadier(Punicagranatum)	9
Figure (I.3): La grenade et ses différentes parties	10
Figure (I.4): L'écorce de la grenade et la membrane blanche	11
Figure (I.5): Feuilles de Punicagranatum.....	12
Figure (I.6): Fleurs de punicagranatum	12
Figure (I.7): Fruit de Punicagranatum	13

Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante

Figure (II.1): Différentes classes des composés phénoliques	17
Figure (II.2): Squelette de base (A) et classement (B) des flavonoïdes	19
Figure (II.3): Structures chimiques des flavanones	20
Figure (II.4): Structures chimiques des flavonols	20
Figure (II.5): Structures chimiques de flavan-3-ols	21
Figure (II.6): Structures chimiques des flavones.....	21
Figure (II.7): Structures chimiques des isoflavones	22
Figure (II.8): Structures chimiques des anthocyanes	22
Figure (II.9): Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b).....	23
Figure (II.10): Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'ungallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose)	24

Chapitre III : Matériels et Méthodes

Figure (III.1): Trois types d'échantillonnages des Grenadiers	33
Figure (III.2): Protocole de préparation des extraits	34
Figure (III.3): La spectrophotométrie UV-visible	35
Figure (III.4): Réduction du radical libre DPPH	38
Figure (III.5): Voltammogramme cyclique typique pour un simple processus réversible d'oxydo- réduction.....	40
Figure (III.6): Dispositif expérimental de la voltampérométrie	41
Figure (III.7): Schéma du dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé	42

Chapitre IV : Résultats et discussion

Figure (IV.1): Rendement d'extraction	44
Figure (IV.2): Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	45
Figure (IV.3): Teneurs des polyphénols totaux des extraits	46
Figure (IV.4): Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux	47
Figure (IV.5): Teneurs des flavonoides totaux dans extraits	48
Figure (IV.6): Courbe d'étalonnage pour le dosage des falvonols totaux	49
Figure (IV.7): Teneurs en flavanols totaux dans les extraits.....	50
Figure (IV.8): polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavanols totaux dans les extraits fruits entier, écorce et grains	50
Figure (IV.9): comparaison entre IC ₅₀ des différentes extraits	52
Figure (IV.10): Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait des écorces.....	52
Figure (IV.11): Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait des grains.....	53
Figure (IV.12): Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait du fruit entier.....	53
Figure (IV.13): Comportement de l'électrolyte (KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄).....	54
Figure (IV.14): Voltampérogrammes cycliques pour les différentes concentrations de l'acide gualique.....	55
Figure (IV.15): Droite d'étalonnage de l'acide gualique.....	56
Figure (IV.16): Voltampérogrammes cycliques des échantillons (A) fruit entier, (B) écorce et (C) grain.....	57
Figure (IV.17): Activité antioxydante totale des différentes extrais.....	59

Liste des Tableaux

Chapitre I : Généralités	
Tableau (I.1): Composition nutritionnelle de la partie comestible (L'officinal, 2011)	13
Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante	
Tableau (II.1): Principaux acides hydroxycinnamiques	17
Tableau (II.2): Principaux acides hydroxybenzoïques	18
Tableau (II.3): Principaux types de coumarines	18
Tableau (II.4): Activités biologiques des composés phénoliques	25
Tableau (II.5): Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse	27
Chapitre IV : Résultats et discussion	
Tableau (IV .1): Les rendements des extraits bruts	44
Tableau (IV.2) : Teneurs des polyphénols totaux des extraits	46
Tableau (IV.3) : Teneurs des flavonoïdes totaux des extraits	47
Tableau (IV.4) : Teneurs des flavanols totaux dans les extraits	49
Tableau (IV.5): Valeurs des IC ₅₀ du DPPH pour les extraits.....	51
Tableau (IV.6): Valeurs des densités du courant en fonction de la concentration d'acide gualique.....	55
Tableau (IV.7): Paramètres électrochimiques des échantillons du grenadier.....	58
Tableau (IV.8): Activités antioxydantes totales des différents échantillons du grenadier	58

TABLE DES MATIÈRES



Sommaire

Introduction Générale.....	2
----------------------------	---

Partie Bibliographique

Chapitre I : Généralités

I.1. Origine.....	6
I.2. Caractéristique botanique	6
I.3. Différente nomenclature de la grenade.....	7
I.4. Classification	8
I.5. Description de l'espèce	8
I.6. Répartition géographique	9
I.7. Composition chimique	10
I.7.1. L'écorce de la racine.....	10
I.7.2. L'écorce de la grenade ou malicorium et la membrane blanche.....	11
I.7.3. Les feuilles.....	12
I.7.4. Les fleurs.....	12
I.7.5. Le fruit.....	13
I.8. Activité biologique.....	14
I.8.1. Activité antioxydants.....	14
I.8.2. Activité anti-inflammatoires.....	14
I.8.3. Activité anticancéreuse.....	14
I.8.4. Activité antidiabétique	14
I.8.5. Activité antimicrobiennes	15
I.8.6. Activité antiulcéreuse.....	15
I.8.7. Action cicatrisante de la grenade.....	15
I.8.8. Autres propriétés de grenade.....	15

Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante

II.1. Les composés phénoliques.....	16
II.1.1. Généralités.....	16
II.1.2. Localisation.....	16
II.1.3. Classification des composés phénoliques	16
II.1.3.1. Polyphénols simples	17
II.1.3.1.1. Acides phénoliques	17

II.1.3.1.2. Les flavonoïdes	18
II.1.3.1.3. Alcools phénoliques	23
II.1.3.2. Polyphénols complexes (tannins)	23
II.1.4. Le rôle des composés phénoliques	24
II.1.4.1. Rôle physiologique.....	24
II.1.4.2. Rôle technologique.....	25
II.1.4.3. Rôle biologique.....	25
II.2. Activité antioxydant.....	26
II.2.1. Définition d'un radical libre.....	26
II.2.2. Définition d'un Antioxydants.....	26
II.2.3. Les sources des antioxydants.....	27
✓ Les antioxydants synthétisés.....	27
✓ Les antioxydants naturels.....	27

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III. Matériel et méthodes.....	31
III.1. Matériel.....	31
III.1.1. Matériel du laboratoire	31
a) Appareillage.....	31
b) les logiciels	32
c) Produit chimiques	32
III.1.2. Matériel végétal.....	32
III.1.2.1 Préparation des échantillons.....	32
III.2. Extraction du matériel végétal.....	33
III.2.1. Préparation des extraits.....	33
III.2.2. Analyse des extraits.....	35
III.2.2.1. La spectrophotométrie UV-visible.....	35
✓ Définition.....	35
✓ Principe.....	35
III.2.3. Dosage des composées phénoliques.....	36
a) Dosage des Polyphénols totaux (PPT)	36
b) Dosage des flavonoïdes totaux (FVT):	36
c) Dosage des Flavanols Totaux (FLA).....	37
III.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extrais.....	37

III.3.1. Test DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl)	37
III.3.2. Méthode électrochimique	39
III.3.2.1. Voltamétrie cyclique (CV)	39
III.3.2.2. Principe.....	39
III.3.2.3. Instruments utilisées pour une manipulation d'électrochimie.....	40
✓ potentiostat.....	40
✓ Cellule électrochimique.....	40
III.3.2.4. Etude de l'activité antioxydante du grenadier.....	42

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion.....	44
IV.1. Rendement d'extraction	44
IV.2. Etude quantitative des extraits	45
IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux(PPT).....	45
IV.2.2. Dosage des flavonoïde totaux(FVT).....	47
IV.2.3.Dosage des flavanols totaux (FLA).....	48
IV.2.4. Comparaison entre les différents extraits en composition phénoliques	50
IV.3.Evaluation de l'activité antioxydant.....	51
IV.3.1. Méthode chimique :Test du radical libre DPPH	51
IV.3.2. Méthode électrochimique : Voltampérométrie cyclique	54
IV.3.2. 1.Etude électrochimique du comportement de l'électrolyte.....	54
IV.3.2. 2.Etude électrochimique du comportement de l'acide gualique.....	54
IV.3.2. 3. Courbe d'étalonnage de l'acide gualique.....	55
IV.3.2. 4.Evaluation de l'activité antioxydante totale (AAT).....	56
IV.3.2. 5.Voltampérogrammes cycliques des échantillons.....	57
A. Paramètres électrochimiques.....	58
B. Interprétation des résultats.....	58
Conclusion Générale.....	61
References Bibliographique	63

INTRODUCTION GÉNÉRALE



INTRODUCTION GÉNÉRALE

On a long temps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du XIX^{ème} siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à un type de molécule.

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures in vivo et in vitro de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicaux[1].

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits[2].

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé [3].

En Algérie pays très riche de sa biodiversité florale, la médecine traditionnelle y a sa place mais on ne voit pas cette complémentarité de la phytothérapie à la médecine. Botanistes, phytochimistes, pharmacologues et médecins sont appelés à conjuguer leurs connaissances scientifiques pour que la phytothérapie soit une discipline thérapeutique officielle comme c'est le cas dans plusieurs pays (Chine, Turquie, etc...) [4].

Les fruits du Grenadier (*Punicagranatum L*) ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs sont utilisés depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales et thérapeutiques dans plusieurs régions où cet arbuste est originaire (bassin méditerranéen, Moyen-Orient, sud de l'Asie et Amérique latine) [05]. Utilisé, de façon empirique, dans les médecines traditionnelles, pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. Il a été abandonné ensuite en raison de la toxicité de certains de ses principes actifs, le grenadier fait l'objet, depuis une dizaine d'années, d'un regain d'intérêt, tant sur un plan médical et pharmacologique que sur un plan cosmétologique. [06].

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était de mettre en évidence l'activité antioxydante du grenadier de trois échantillons (écorce, grain et fruit).

Notre travail a été divisé en quatre chapitres, dans le premier chapitre nous avons effectué une généralité sur le grenadier, une description détaillée, sa localisation géographique dans le monde, et son utilisation.

Le deuxième chapitre était consacré aux Polyphénols à l'activité antioxydante.

Dans la troisième chapitre, on a cité la méthode d'extraction des échantillons du grenadier étudiés, leurs rendements d'extraction, leurs teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavanols totaux, ainsi que l'évaluation des activités antioxydantes totales, par la méthode du test DPPH et les méthodes électrochimiques (Voltammétrie cyclique (CV)).

Enfin dans le quatrième chapitre on présente les résultats obtenus et leurs discussions.

BIBLIOGRAPHIE



Chapitre I

GÉNÉRALITÉS



I.1. Origine

La grenade est le fruit du grenadier (*Punica granatum*). Ce petit arbre buissonnant est originaire du bassin méditerranéen, d'Asie Occidentale et du Moyen-Orient, où il est cultivé depuis 5000 à 6000 ans. Son nom est dérivé du latin « granatum » qui signifie « fruit à grain » [7].

La grenade est souvent mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires. Outre la dimension symbolique dont elle était revêtue, la grenade était appréciée à l'époque pour les propriétés vermifuges de son écorce, mais aussi pour sa pulpe désaltérante et son aptitude à se conserver et à résister aux chocs, grâce à son écorce rigide. Les voyageurs et les caravaniers l'emportaient donc avec eux comme provision ; le grenadier s'est ainsi rapidement répandu vers l'Est (Asie) et vers l'Ouest (bassin méditerranéen), grâce aux pépins du fruit. Cet arbre fruitier est aujourd'hui cultivé un peu partout dans le monde, sous les climats chauds et secs [8].

I.2. Caractéristique botanique

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre [9].



Figure(I.1): feuilles, fleurs et fruits de *Punicagranatum*[9].

I.3. Différente nomenclature du grenadier

- Nom scientifique : *Punicagranatum*
- Nom français : grenadier
- Nom anglais : pomegranate
- Nom espagnol : Granado
- Nom italien : Melograno
- Nom arabe : الرمان



I.4. Classification

Le grenadier, *Punicagranatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. la classification est la suivante [10] :

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Myrtales
- Famille : Punicaceae
- Genre : *Punica*
- Espèce : *Punicagranatum*

En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, a été créée par un groupe de botanistes, l'*Angiosperm Phylogeny Group* ou APG. Cette classification phylogénétique réorganise le règne végétal en fonction des critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et d'un gène nucléaire de ribosome. Ainsi, pour certaines espèces végétales, les résultats moléculaires sont en accord avec les anciennes classifications alors que pour d'autres espèces végétales, il est nécessaire de modifier leur position dans la systématique. Ces résultats reconsidèrent la phylogénie des plantes. Cette nouvelle organisation se compose alors de 462 familles réparties dans 40 ordres [11].

Que ce soit dans la classification de Linné ou dans la classification APGII, le genre *Punicane* possède que deux représentants : *Punicagranatum*, d'une part, et *Punicaprotopunica*, d'autre part. Ce dernier est recensé exclusivement sur l'île de Socotra ou Socotora, située dans l'océan Indien, au large des côtes de Somalie.

I.5. Description de l'espèce

Le grenadier (*Punicagranatum* L.), un gros buisson ou arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de beau aspect, appartient à la famille des Punicaceae, division Magnoliophyta, classe Magnoliopsida et à l'ordre des Myrtales. Il est originaire de l'Asie, ou encore dans la région méditerranéenne d'Afrique[12]. Il est depuis longtemps cultivé à butornemental et pour ses fruits comestibles. Ses fruits contiennent de nombreuses graines, chacun enrobé dans une pulpe gélatineuse rouge cramoisi, le tout enveloppé dans une peau (écorce) coriace dont la couleur peut aller du jaune au rouge foncé.

Les fruits sont consommés en frais et sont aussi utilisés pour produire un sirop dont le principal ingrédient est sa pulpe au goût acide. Depuis des milliers d'années, les propriétés astringentes de l'écorce du fruit et de l'arbre sont très prisées en médecine, particulièrement comme vermifuge. Actuellement, la grenade est cultivée dans la plupart des régions à climat chaud, car il a besoin de fortes chaleurs pendant toute la période de fructification [13].

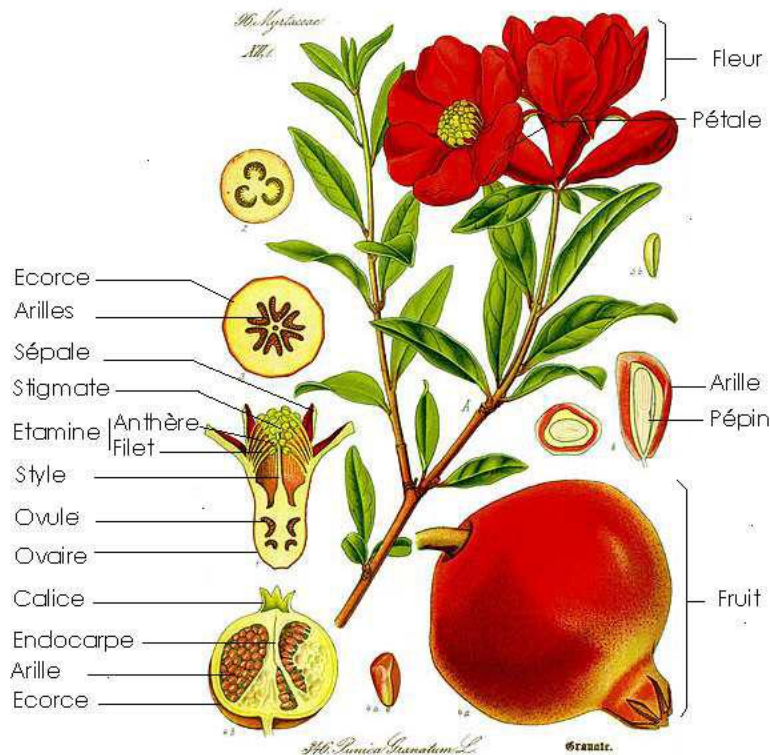


Figure (I.2): Fleurs et fruits du Grenadier (*Punicagranatum*) [14].

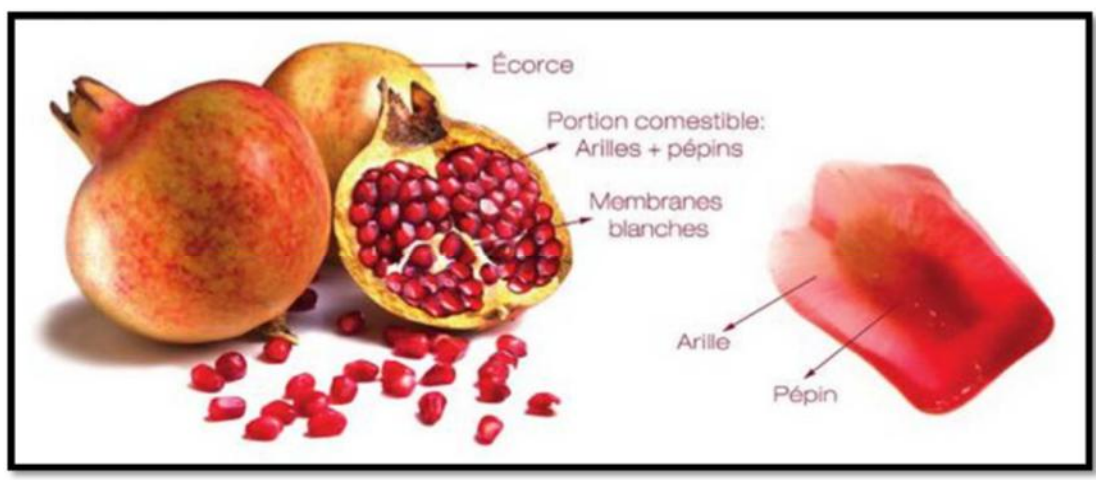
I.6. Répartition géographique

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc. On le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée.

De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique. Il est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride [15].

I.7. Composition chimique

Le grenadier suscite un intérêt chez les chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre, tels que la pelletière. Grâce aux procédés d'analyses chimiques récentes, comme la chromatographie, de résonance magnétique nucléaire ou encore la spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier avec précision la composition chimique des différents organes du grenadier [15].



Figure(I.3): La grenade et ses différentes parties [16].

I.7.1. L'écorce de la racine

L'écorce de la racine du grenadier a été analysée d'abord par Mitouart, en 1824, qui a fait retirer une matière grasse assez abondante, des tanins, de l'acide gallique, une matière résineuse, de la mannite, du sucre et « du ligneux ».

Puis La tour de Trié, en 1831, a trouvé dans cette écorce de la chlorophylle, beaucoup de résine, des tanins, de la matière grasse, et une substance cristalline sucrée qu'il nomme «grenadine ». Il sera montré par la suite que cette substance est simplement de la mannite [16].

C'est en 1878 qu'un pharmacien français, Charles Tanret, a découvert des alcaloïdes dans l'écorce du grenadier, dont le principal été appelé pelletière, et 3 autres qui sont :l'iso pelletière, pseudo pelletière et méthylpelletière . En 1899, Piccinini a ajouté à cette liste un cinquième alcaloïde liquide, isomère de la méthylpelletière, qui est : l'isométhylpelletière[17].Ces alcaloïdes représentent environ 0,70% de l'écorce de racine du grenadier [18].

Plus récemment, l'analyse complète de cette écorce par des techniques modernes, met en évidence la présence d'ellagitannins tels que la punicaline, la punicalagine, les punicalortéines A,

B, C et D, et la punigluconine, ainsi que des alcaloïdes pipéridiniques autres que la pelletière et ses dérivés[19].

I.7.2. L'écorce de la grenade ou *malicorium* et la membrane blanche

Environ 50% du poids total de la grenade correspond à l'écorce et aux membranes blanches, qui sont une source très importante de composés bioactifs tels les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitannins, les proanthocyanidines et les minéraux, essentiellement du potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium[8]. L'écorce coriace et plutôt épaisse est jaune dans certaines variétés [7]. Elle peut reformer jusqu'à 28% des tanins [20].

L'écorce, riche en substances antimicrobiennes et antioxydantes, protège le fruit des prédateurs et des agressions du rayonnement solaire [21].



Figure(I.4) : L'écorce de la grenade et la membrane blanche

I.7.3. Les feuilles

Les feuilles du grenadier contiennent des flavones, telles que la lutéoline et l'apigénine. Cette dernière possède des propriétés anxiolytiques.

Elles renferment également des tanins, comme la punicaline et la unicalagine [19].



Figure (I.5): Feuilles de *Punicagranatum*[15].

I.7.4. Les fleurs

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique [19].



Figure (I.6) : Fleurs de *punicagranatum*

I.7.5. Le fruit

Le fruit possède dans ses différentes parties : écorce, membranes blanches, arilles et pépins. de nombreux composés chimiques [8].



Figure(I.7): Le fruit de *Punicagranatum*

✓ La partie comestible

La composition des graines de grenade est la suivante : eau (85%) ; sucres (10%), principalement fructose et glucose ; acides organique (1,5%) essentiellement acide ascorbique, citrique et malique ; composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes (essentiellement les anthocyanines) [8].

Tableau(I.1) : Composition nutritionnelle de la partie comestible (L'officinal, 2011)

GRENADE (VALEUR NUTRITIVE POUR 100 G)			
Eau : 79 à 80 %	Matières azotées : 1,2 %	Mat. hydrocarbonées : 16 %	
Fibres : 3 à 3,5 g	Valeur énergétique : 52 à 60 kcal		
Protéines : 1 g	Lipides : 0,5 g	Glucides : 13 g	
Sels minéraux & oligo-éléments			
Potassium : 250 mg	Phosphore : 22 mg	Calcium : 11 mg	Magnésium : 5 mg
Sodium : 5 mg	Fer : 1 mg	Zinc : 200 µg	Cuivre : 100 µg
Manganèse : 100 µg			
Vitamines			
Vitamine C : 20 mg	Vitamine B1 : 30 µg	Vitamine B2 : 20 µg	B3/PP/Niacine : 20 µg
Vitamine B5 : 50 µg	Vitamine B6 : 10 µg		
Vitamine A : 30 µg			

En outre, les graines de grenade sont une source importante de lipides, car les pépins ont une teneur en acide gras qui oscille entre 12 et 20 % de leur poids total (poids sec) [8].

I.8. Activité biologique :

I.8.1. Activité antioxydant

Des études *in vitro* ont montré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydant du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux [22]. Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines.

Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydant du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit [23].

I.8.2. Activité anti-inflammatoires

Des études *in vivo* ont montré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénase, enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (principaux médiateurs de l'inflammation), a été inhibée de 37% par l'extrait d'huile de graines pressées. La lipo-oxygénase, qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en leukotriènes, aussi médiateurs importants de l'inflammation, ont été inhibés de 75% par le même extrait [24].

I.8.3. Activité anticancéreuse

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont montré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développement de la tumeur [25]. Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l'apoptose [26].

Une étude clinique en phase II portant sur 46 hommes ayant le cancer de prostate récurrent a illustré que 35% des patients montraient une diminution significative du taux sérique de PSA (Prostate Specific Antigen) durant le traitement avec du jus de grenade. La même étude a indiqué que le grenadier pourrait affecter le cancer de prostate grâce à la combinaison de ses propriétés antiproliférative, apoptotique, antioxydante et anti-inflammatoire [27].

I.8.4. Activité antidiabétique

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l'absorption et augmente l'excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL en améliorant les

ratios total/HDL et LDL/HDL. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques [28]. sans affecter les paramètres diabétiques [29].

I.8.5. Activité antimicrobiennes

L'écorce du fruit de *Punicagranatum* possède donc, *in vitro*, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes [30].

I.8.6. Activité antiulcéreuse

L'écorce de grenade séchée en poudre présente un efficace traitement efficace contre l'acidité d'estomac et l'ulcère d'estomac [31]. L'extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol grâce à ses propriétés antioxydantes. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d'extrait hydroalcoolique de grenade (70% méthanol v/v), le pourcentage d'inhibition est respectivement de 22,37% et 74,21% pour les ulcères induits à l'aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l'éthanol [32].

I.8.7. Action cicatrisante de la grenade

Comparé à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de peau de grenade (44% de composés phénoliques) à 5% permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de 10 jours, les rats traités au gel à l'extrait de peau de grenade ont été guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins [33].

Les analyses par HPLC montrent que les composants majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique [33].

I.8.8. Autres propriétés de grenade

Le jus de grenade stimule le foie et la rate. Il renforce la qualité de sang, permettant de mieux nourrir les tissus. Il est très régénérant pour le cœur et le tissu reproducteur. Il est aussi très détoxifiant comme le jus de citron, mais sans acidité. Il donne de vitalité et stimule l'immunité physique et mentale [34].

L'écorce, les racines de l'arbre, et parfois mêmes les écorces du fruit, sont utilisées contre les parasites intestinaux, en particulier le vers solitaire (ténia) et la dysenterie amibienne. Elles contiennent des alcaloïdes, dont la pelletiérine, vermifuge efficace contre le ténia, inscrite au Codex de pharmacopée française depuis 1937 [21].

Chapitre II

POLYPHENOLS ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE



II.1. Les composés phénoliques

II.1.1. Généralités :

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques[35], sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent au métabolisme secondaire [36]. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement [37]. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel [38].

Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés [39]. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside [40, 41].

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés)[42].

II.1.2. Localisation

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) [43]. Ils sont présents aussi dans diverses substances naturelles comme les fruits rouges, le raisinetc [44]. Parmi les composés phénoliques, qui sont connus : flavonoïdes, quinones phénoliques, ligands, xanthones, coumarines et d'autres classes existent en nombre considérable [43].

II.1.3. Classification des composés phénoliques

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux[45]. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes[46].

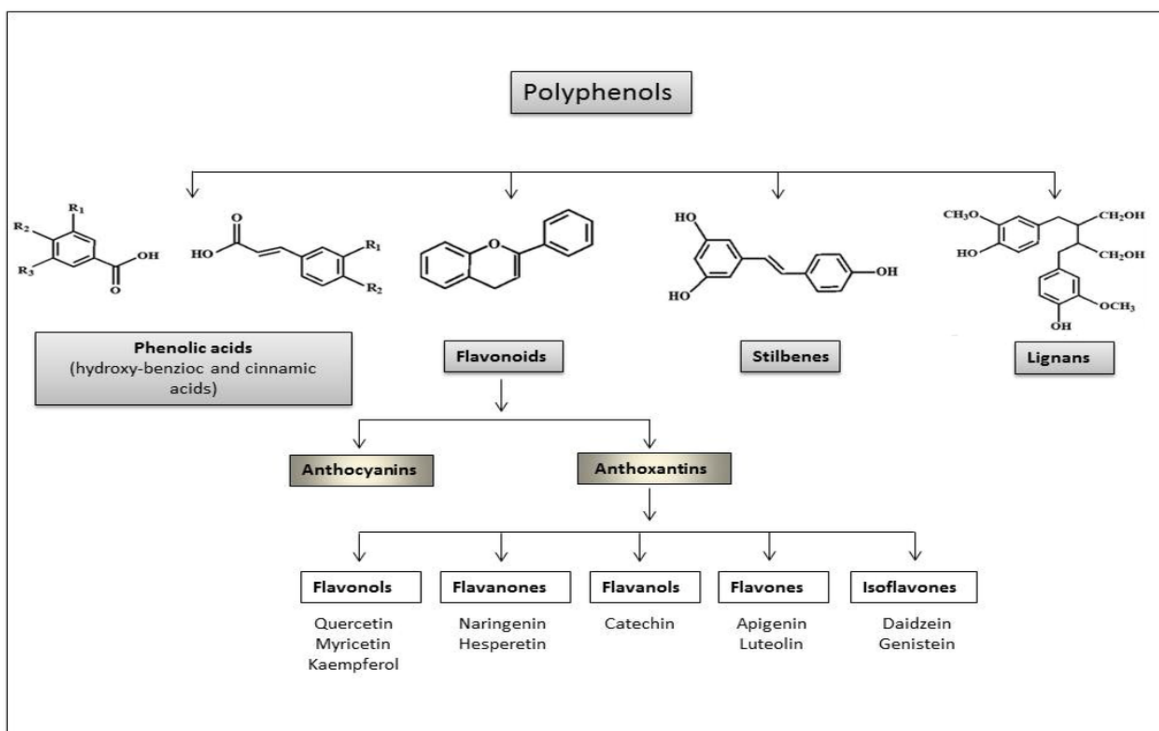


Figure (II.1): Différentes classes des composés phénoliques. [47].

II.1.3.1. Polyphénols simples

II.1.3.1.1. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et unhydroxyle phénolique[48].

➤ Acides hydroxycinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C₆-C₃). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules [49].

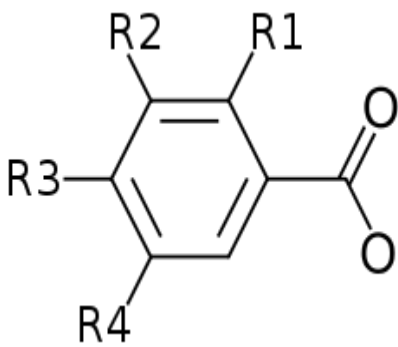
Tableau (II.1) : Principaux acides hydroxycinnamiques[50].

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acid p-coumarine
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

➤ Acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C₆-C₁). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau suivant [49].

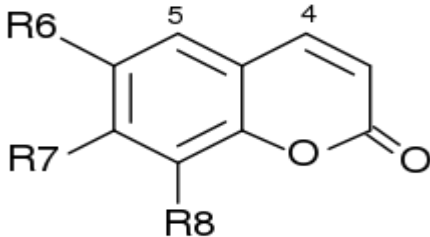
Tableau (II.2): Principaux acides hydroxybenzoïques .[50]

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechine
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

➤ Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxy cinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique[49].

Tableau (II.3) : Principaux types de coumarines .[38]

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH ₃	OH	H	Scopolétole
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

II.1.3.1.2. Les flavonoïdes

Du latin flavus, jaune, sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux : on les trouve dissoutes dans les vacuoles à l'état d'hétérosides ou comme constituant des plastes particuliers, les chromoplastes [51].

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C)[52].

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C₆-C₃-C₆ [53], en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule[54,55]. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits, jus de fruits, thé et vin...).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides [56].

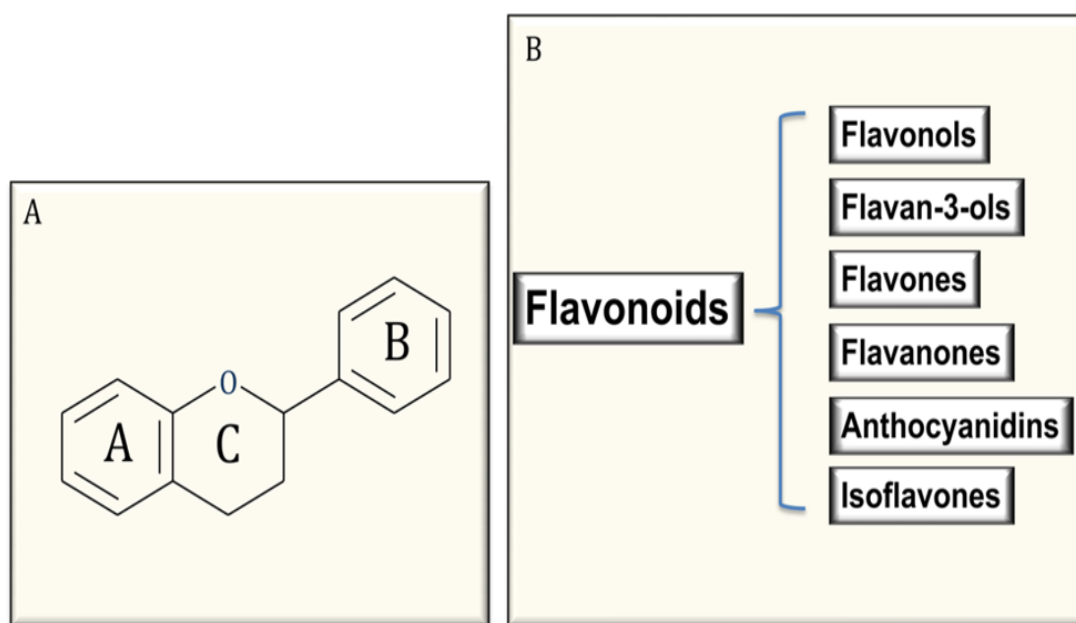


Figure (II.2) : Squelette de base (A) et classement (B) des flavonoïdes [56].

✓ **Flavanones**

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C₂ et C₃ et par la présence d'un centre de chiralité en C₂ [42,50]. Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones. Les principaux aglycones sont l'ériodictyol dans le citron, la naringénine dans le pamplemousse et l'hespéritine dans l'orange, un jus d'orange contient entre 200 et 600 mg d'hespéritine/L [57].

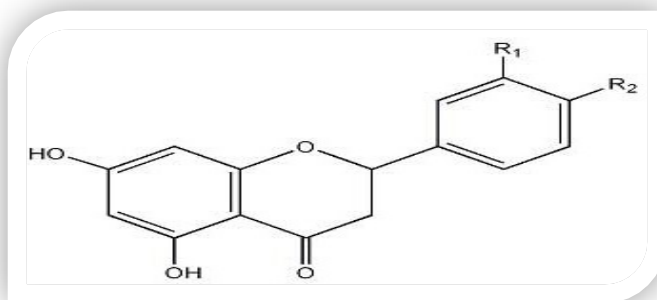
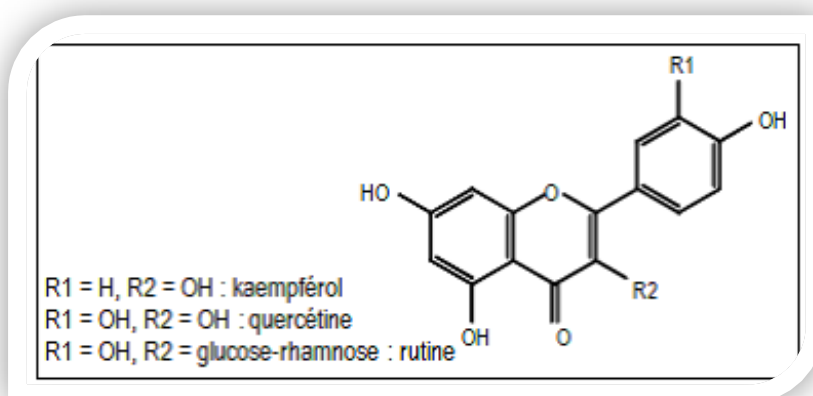


Figure (II.3) : Structures chimiques des flavanones[63].

✓ Flavanols

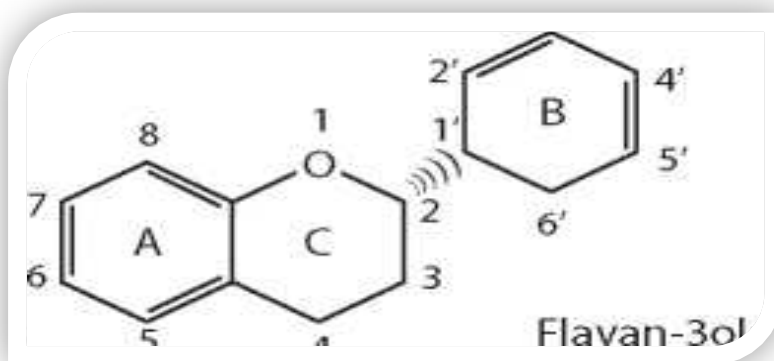
Les flavanols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison en C6-C3. Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les trois principales structures sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière fraîche)[58, 55], le poireau, le chou et les baies telles que le cassis (115 mg/kg de matière fraîche) [59]. Le thé contient aussi des flavanols à hauteur de 45 mg/L [60].



Figure(II.4) : Structures chimiques de flavonols[63].

✓ Flavan-3-ols

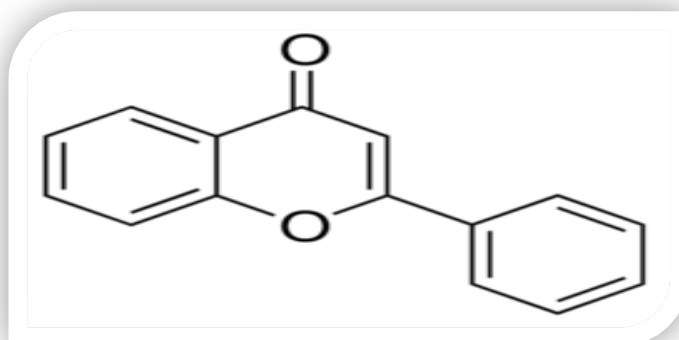
Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines (épicatechine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate) [56]. Les catéchines sont présentes dans le chocolat (jusqu'à 132,4 mg/kg de matière fraîche de chocolat noir), le thé (jusqu'à 120 mg du thé noir de Chine) et dans les fruits comme l'abricot [61, 62].



Figure(II.5): Structures chimiques de flavan-3-ols [56].

✓ Flavones

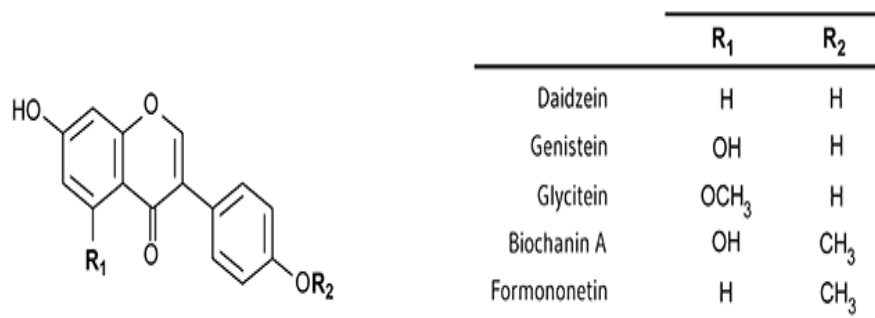
Dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle . Dans plus de 90%, le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C₅ et C₇. Par exemple: Glucoside d'apigénine chez le blé et la tricine chez le blé [63].



Figure(II.6):Structures chimiques de flavone[63].

✓ **isoflavones:**

Ils dérivent aussi des flavanones mais outre une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C2 au C4 de l'hétérocycle [63].



Figure(II.7): Structures chimiques des isoflavones[63].

✓ **anthocyanes**

Le terme « anthocyanes » a une valeur générale désignant, soit les formes naturelles glycosylées, soit les molécules non glycosylées. Chez les anthocyanes, en plus de la position 3 qui est toujours glycosylée, il y a aussi préférentiellement la position 5 est glycosylée[38].

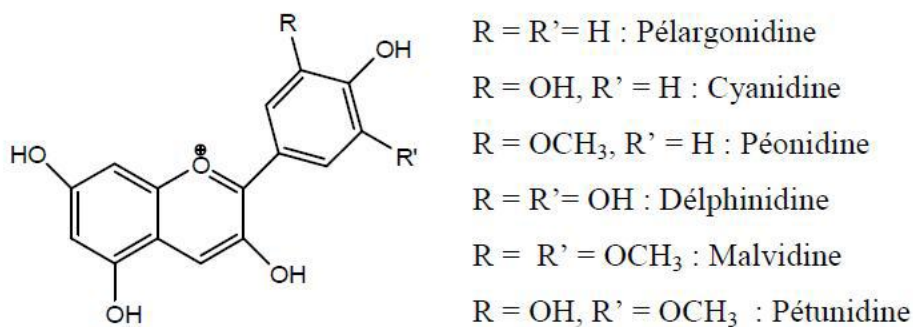


Figure (II.8) : Structures chimiques des anthocyanes [63].

II.1.3.1.3. Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) (**Fig.II.9**) sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique[64, 65].



Figure (II.9): Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b).

II.1.3.2. Polyphénols complexes (tannins)

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités. Le terme tannin vient de la source de tanins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tanins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes.

Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines [66].

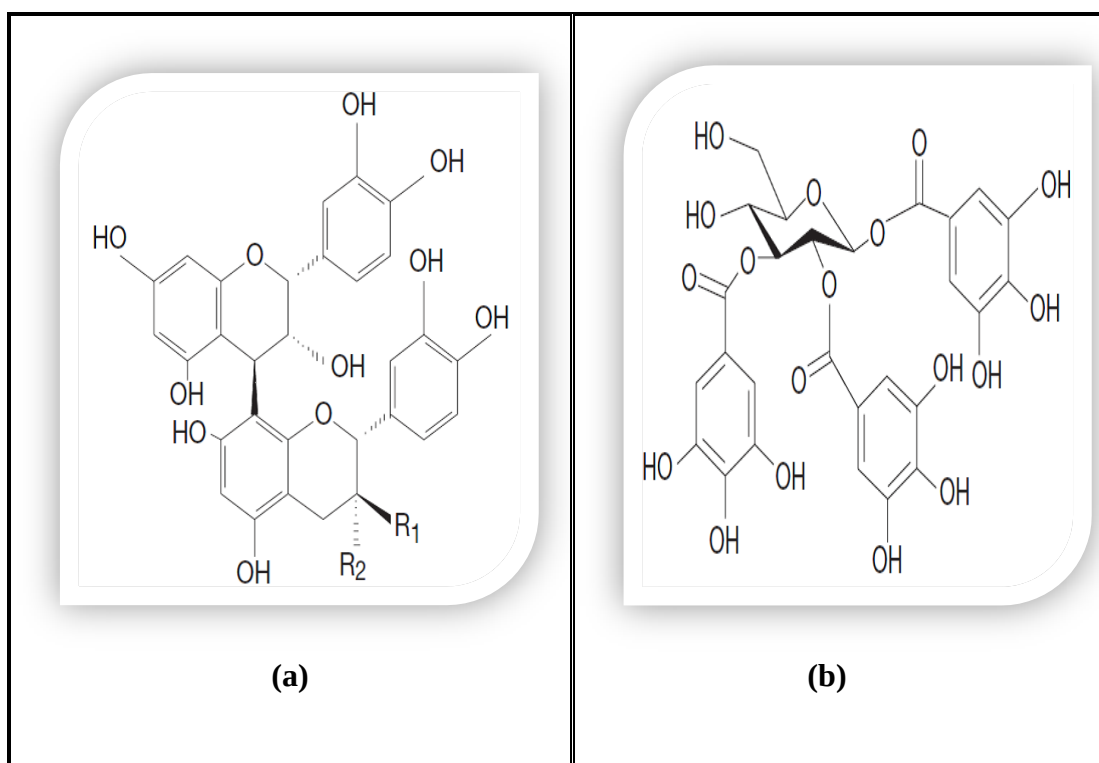
✓ Les tannins hydrolysables

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins, aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C₃ de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines se couplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins.

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres). L'acide gallique provient de la β -oxydation des composés C₆-C₃, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur [67].

✓ Les tannins condensés

Les tanins condensés, appelés aussi les proanthocyanidines sont des polymères formés d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéches (trihydroxylées) [68].



Figure(II.10): Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'ungallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose) [68].

II.1.4. Le rôle des composés phénoliques

II.1.4.1.Rôle physiologique

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols sont associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, floraison et tubérisation [69].

Par exemple les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV [70].

Ils sont impliqués dans la réaction de défense du palmier dattier contre le *bayoud*, maladie infectieuse due à un champignon tel que *Fusariumoxysporum*[71].

II.1.4.2. Rôle technologique

Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyanes et certains flavonoïdes participent à la coloration des fruits murs, ils confèrent aux fruits et légumes leur teinte rouge ou bleutée, ils sont aussi responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de leurs teneurs [72].

II.1.4.3. Rôle biologique

Tableau (II.4) : Activités biologiques des composés phénoliques [44].

Polyphénols	Activités
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaires et veineux
Proanthocyanidines Antifongiques Anti-inflammatoires	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes

II.2. Activité antioxydante

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme [73].

II.2.1. Définition d'un 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 réappairier, 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 [74].

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 peroxy $\text{ROO}\cdot$, radical alkoxy $\text{RO}\cdot$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [75].

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 $\text{O}_2\cdot$, radical hydroxyl $\text{OH}\cdot$, monoxyde d'azote $\text{NO}\cdot$, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxydinitrite ONOO^- [76].

II.2.2. Définition d'un antioxydant

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par HALLIWELL [77] comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

II.2.3. Les sources des antioxydants

✓ Les antioxydants synthétisés

Les antioxydants de synthèse sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases. Leur concentration d'utilisation est généralement dix fois plus faible que celle des conservateurs et se situe entre 0,02 et 0,05 %. Ce sont :

- le butylhydroxytoluène (BHT)
- le butylhydroxyanisole (BHA)
- les gallates de propyle, octyle et de dodécyle

Le tableau (II.5) montre quelques limites d'utilisation des antioxydants de synthèse[65].

Tableau (II.5): Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse[65].

Nature de l'aliment	Antioxydant	Concentration maximale (ppm)
Saïndoux, graisse de boeuf, de volaille et mouton, huile de poisson.	Gallates et BHA seuls ou en mélange	200
	BHT	100
Compléments alimentaires	Gallates, BHT et BHA	400
Soupes et viandes déshydratées, lait en poudre	Gallate et BHA seuls ou en mélange	200

✓ Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, les vitamines (E, C, P.), les composés phénoliques[78].

❖ La Vitamine C : Acide ascorbique :

Est largement répandue dans les fruits comme : les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi. Elle joue un rôle important dans la régénération du vitamine E.

❖ **La vitamine E :**

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales (arachides, soja, chardon, tournesol, olive pressé à froid), les amandes, les graines, le lait, les œufs, les légumes à feuilles vertes.

❖ **Le β carotène**

Il est présent dans les légumes vertes, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards, la papaye[79].

PARTIE

EXPÉRIMENTALE



Chapitre III

MATÉRIEL ET MÉTHODES



III. Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS) et au laboratoire de la pédagogie n° 2 de l'université Echahid Hamma Lakhdar El Oued.

- **Objectif général :**

Etudier les différentes parties du fruit grenadier « *PUNICA Granatum* » (étude quantitatif et activité antioxydante).

- **Objectifs spécifiques :**

- Extraction des différentes parties du fruit grenadier : fruit entier, graines et écorces.
- Dosage des Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavanols totaux.
- Etude de l'activité antioxydante par deux méthodes : méthode chimique et méthode électrochimique.

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel du laboratoire

a) Appareillage :

Appareillage
- UV spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU).
- Evaporateur rotatif (Rotavapor BUCHI Heating bath R-210).
- Un Potentiostat /Galvanostat model PGZ 301(radiomètre analytical SAS).
- Etuve (Mommert, Beschickung-Loadig Modell 100-800).
- Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0.001g)
- Verrerie : béchers, pipettes, ballons, éprouvettes graduées, tubes à essais, pipète et micro pipète.

b) les logiciels :

les logiciels
- Logiciel Origin Pro 8, pour dessiner les courbes d'étalonnages.
- Logiciel Microsoft office Excel 2007, pour les calculs et pour exporter les résultats vers le logiciel Origin Pro 8.
- Logiciel VoltaMaster4, version 7.08, pour l'obtention des voltamogrammes cycliques.

c) Produits chimiques:

Produits chimiques	Production
- Acide gallique 99% ($C_7H_6O_5$)	PROLABO
- Rutine 97% ($C_{27}H_{30}O_{16}$)	ALFA AESAR
- Quercitane dihydraté 97% ($C_{15}H_{10}O_7$)	ALFA AESAR
- DPPH 95% ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)	ALFA AESAR
- Trichlorure d'aluminium ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$)	BIOCHEM Chemopharma
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	BIOCHEM Chemopharma
- Acétate de sodium (CH_3COONa)	BIOCHEM Chemopharma
- Réactif de Folin Ciocalteu ($3H_2O, P_2O_5, 13WO_3, 5MoO_3, 10H_2O$)	PROLABO
- Ethanol 96% (CH_3-CH_2-OH)	SIGMA- ALDRICH
- méthanol 99% (CH_3-OH)	BIOCHEM Chemopharma
- solution tampon KH_2PO_4 / K_2HPO_4 (pH =7,2)	

III.1.2. Matériel végétal :**III.1.2.1 Préparation des échantillons**

La matière utilisée au cours de notre étude est le grenadier frais qui a été récolté au mois de Janvier 2017 d'un village de Teghzout (El-oued) . Nous avons travaillé sur trois échantillons qui sont : le fruit entier du grenadier, leurs écorces et les grains. Comme le représente la figure (III.1)

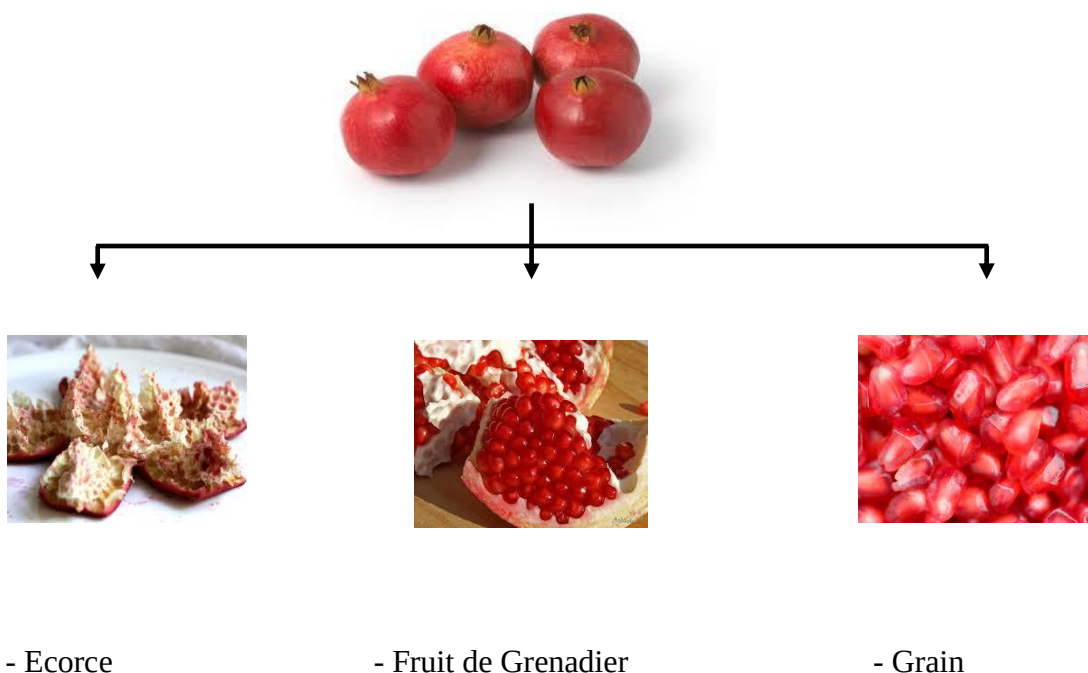


Figure (III.1) : Trois types d ' échantillonnages des Grenadiers

III.2. Extraction du matériel végétal :

Pour l'isolement des substances naturelles avec l'utilisation des solvants ; si le composé qu'on veut séparer est liquide on applique la méthode liquide-liquide, si le composé est solide on applique l'extraction solide-liquide [80]. Dans notre travail on a utilisé l'extraction par macération.

III.2.1. Préparation des extraits

✓ Macération

30 g de chaque matière à extraire ont été macérés à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 h avec 150 ml du mélange éthanol/eau (1: 5 V/V). Cette étape a été répétée trois fois, les extraits hydro alcooliques obtenus ont été récupérés à chaque fois et rassemblés, après filtration sur entonnoir et papier filtre, le solvant a été éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide, à une température de 60°C. Les résidus secs obtenus ont été récupérés dans des flacons en verre hermétiquement fermé et conservés à la température -2°C dans un congélateur.

Les extraits obtenus sont préservés pour l'étape suivante qui est l'étape d'analyse, la figure (III.2) montre le protocole d'extraction .

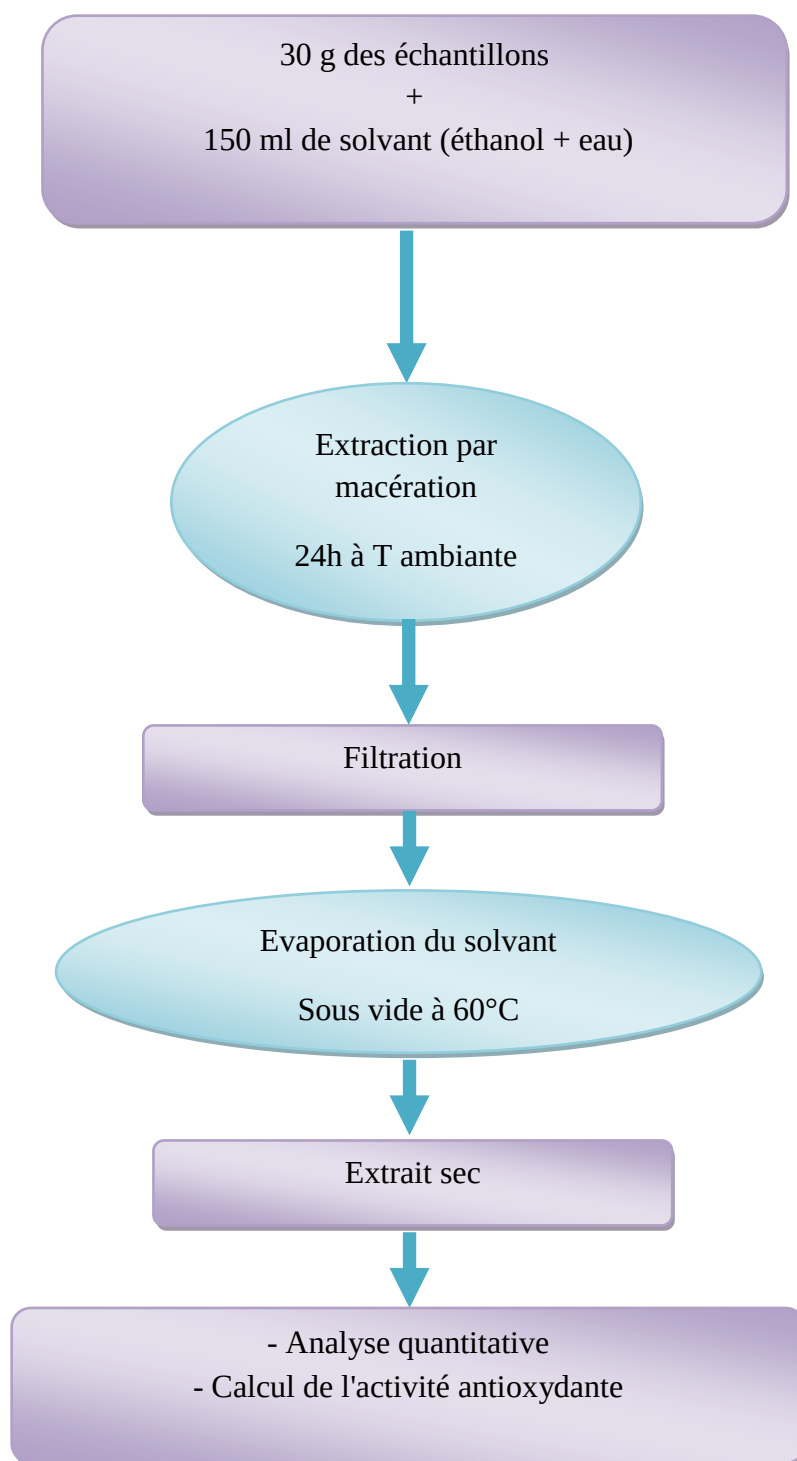


Figure (III.2) : *Protocole de préparation des extraits*

III.2.2. Analyse des extraits :

III.2.2.1. La spectrophotométrie UV-visible :

➤ Définition :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer– Lambert (figure III.3).

➤ Principe :

Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques, l'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance $A = \epsilon.l.c$.

Pour valider la loi de Beer-Lambert il faut travailler en lumière monochromatique, les solutions utilisées doivent être diluées et homogènes, et le soluté ne doit pas donner de réactions sous l'effet de la lumière incidente [81].



Figure (III.3) : Spectrophotomètre UV-visible

III.2.3. Dosage des composées phénoliques :

a) Dosage des Polyphénols totaux (PPT):

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi avec le réactif de Folin-Ciocalteu [82].

✓ Principe

Le réactif de Folin- Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux [83].

✓ Mode opératoire

Mettre 0,2 ml de chaque extrait dans des tubes à essais ; ajouter 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans de l'eau distillée ; puis laisser agir 5 min avant d'ajouter 0,8ml de carbonate de sodium à 7.5%. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 765 nm.

On effectue la même opération pour l'acide gallique à différentes concentrations. Le blanc est représenté par le solvant utilisé additionné du Folin-Ciocalteu et de carbonate de sodium. Toutes les mesures sont répétées 3 fois. Les concentrations des Polyphénols totaux contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent en acide gallique/ g d'extrait.

b) Dosage des flavonoïdes totaux (FVT):

La méthode utilisée pour l'estimation des taux des flavonoïdes est celle décrite par Ordenez.

✓ Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le réactif trichlorure d'aluminium $AlCl_3$. Ce réactif forme un complexe jaune très stable avec les groupement hydroxydes OH des phénols [84].

✓ Mode opératoire

Mettre 1ml d'extrait dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % ; laisser incubé 1h à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 420 nm.

On effectue la même opération pour la rutine à différentes concentrations, en introduisant 1ml de ces dernières dans une série de tubes, on ajoute de 1 ml d' AlCl_3 à 2%. Le blanc est représenté par le solvant utilisé additionné à l' AlCl_3 . La concentration des flavonoïdes est déduite à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la rutine, elle est exprimée en milligramme d'équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg ER/g d'extrait).

c) Dosage des Flavanols Totaux(FLA) :

La méthode utilisée pour l'estimation de taux de flavanols est celle décrite par Kumaran et Karunakaran

✓ Mode opératoire

Mettre 2 ml d'extrait dans un tube à essai ; ajouter 2 ml de solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % puis 3 ml d'acétate de sodium à 50g/l, laisser incubé 2,5 h à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 440 nm.

La quantification des flavanols se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavanol standard : la quercétine. La teneur en flavanols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par un gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

III.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits :

Pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des échantillons, on utilise deux méthodes :

- La méthode chimique qui repose sur le piégeage du radical libre DPPH.
- La méthode électrochimique qui repose sur la technique de la voltamétrie cyclique

III.3.1. Test DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl)

✓ Principe

L'activité antioxydante des composés phénoliques contenus dans les extraits préparés est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl). Sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction [85]. La figure(III.4) représente la réduction du radical libre DPPH.

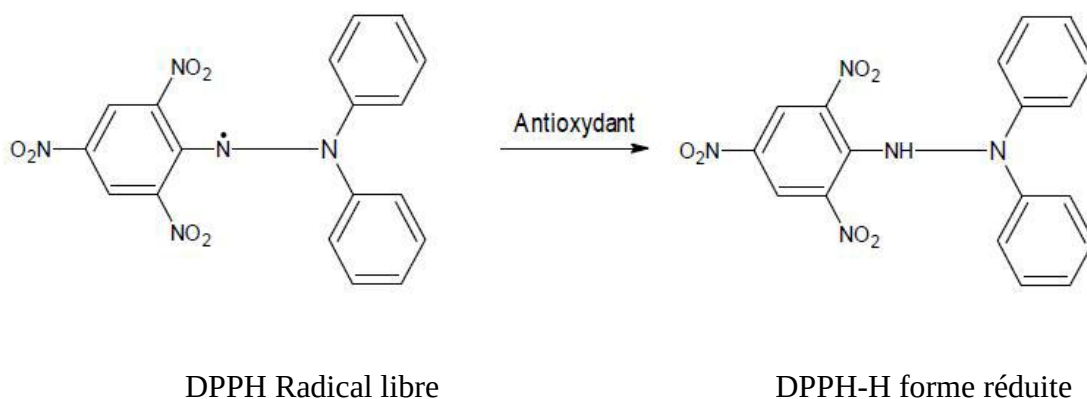


Figure (III.4) : Réduction du radical libre DPPH

✓ Mode opératoire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Brand-Williams, Cuvelier et Berset [80].

Une solution méthanolique de 0,1 mM de DPPH est mélangée avec les différentes solutions des extraits, mettre 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 2ml de solution méthanolique de DPPH. Les absorbances sont mesurées à 515 nm après incubation des solutions pendant 30 minutes à l'obscurité. Le pourcentage de piégeage du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité Antioxydante} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

Avec :

A₁ : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A₂ : absorbance en présence d'extrait.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la IC₅₀, sachant que l'IC₅₀ est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH [86].

Il faut rappeler que plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande.

III.3.2. Méthode électrochimique :

Les méthodes électrochimiques sont basées sur des réactions d'oxydoréductions qui sont le siège d'un échange d'électrons entre l'oxydant et le réducteur.

III.3.2.1. Voltamétrie cyclique (CV) :

La voltamétrie cyclique est une méthodes analytique qui permet de préciser les conditions dans lesquelles une réaction d'oxydation et de réduction est réalisable par voie électrochimique et éventuellement d'en établir le mécanisme [88].

Le principe général de la voltampérométrie est donc l'obtention d'une réponse (le courant) du système étudié à l'excitation (le potentiel) responsable de la réaction électrochimique désirée. Cette opération est réalisée en effectuant une exploration par imposition et variation progressive du potentiel d'électrode (balayage de potentiel). Pour pouvoir imposer le potentiel d'électrode, le faire varier et produire ainsi des réactions électrochimiques, il faut opérer dans une cellule d'électrolyse comportant trois électrodes auxquelles un circuit extérieur se trouve connecté.

III.3.2.2. Principe :

La connaissance des caractéristiques fondamentales des réactions électrochimiques est obtenue sur le plan expérimental, au moyen de la détermination de figures qui expriment la relation entre le courant et le potentiel d'électrode. Ces figures sont appelées voltampérogrammes ; leur détermination est l'objet de la voltampérométrie.

L'analyse de la figure obtenue (réponse I en fonction de E) renseigne sur les propriétés qui déterminent sa forme (figure III.5) [88].

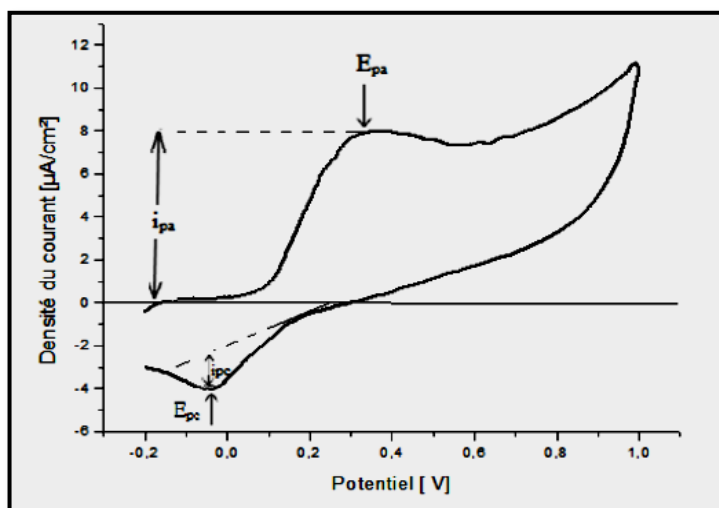


Figure (III.5) Voltammogramme cyclique typique pour un simple processus réversible d'oxydo-réduction (E_{pa} et E_{pc} sont les potentiels d'oxydations et de réductions) [88].

III.3.2.3. Instruments utilisés pour une manipulation d'électrochimie

✓ potentiostat

Un Potentiostat est un appareil dont le rôle est d'imposer une différence de potentiel constante entre l'électrode de travail (ET) et l'électrode de référence (ER) tout en fournissant la puissance nécessaire à la cellule. Il mesure le courant traversant l'électrode auxiliaire (EA) et l'électrode de travail (figure III.6) [87].

✓ Cellule électrochimique :

La cellule électrochimique est composée de l'association d'un conducteur ionique (électrolyte dans un solvant, sels fondus, par exemple : LiCl, KCl), et trois électrodes : une électrode de travail, une contre-électrode et une électrode de référence. Le courant passe entre l'électrode de travail et la contre-électrode, l'électrode de référence servant à contrôler du potentiel. Sur l'électrode de travail se passent les réactions d'oxydation et de réduction des composés à caractériser [88].

• Electrodes

On distingue, plusieurs types d'électrodes en fonction de l'application envisagée ; on utilise dans cette étude trois types d'électrodes :

- une électrode de travail sur laquelle on examine les différents processus électrochimiques à explorer.
- une électrode de référence dont le potentiel est constant et connu, ce qui permet ainsi de contrôler le potentiel à l'électrode de travail.

- c) une électrode auxiliaire appelée aussi contre-électrode qui permet de mesurer le courant circulant dans la cellule électrochimique.

- **Electrolyte**

En général, on utilise des solutions contenant outre les espèces électroactives, un sel d'électrolyte support totalement dissocié permettant de saturer la solution. Dans ces conditions le tracé d'un voltampérogramme est de quelques millisecondes à quelques minutes. Afin d'éliminer, quand il est nécessaire, l'oxygène dissous, le mode opératoire généralement utilisé est de faire barboter un gaz inerte pendant quelques minutes [87].

La figure (III.6) représente le dispositif expérimental de la voltampérométrie.

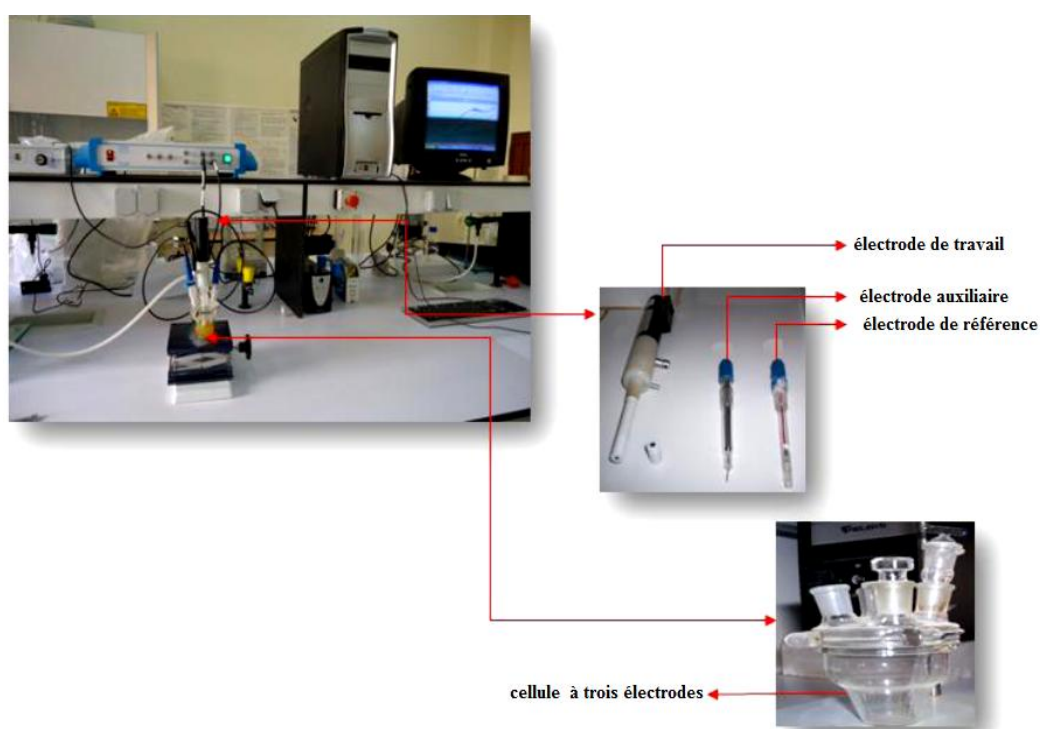


Figure (III.6) : *Dispositif expérimental de la voltampérométrie*

La figure(III.7) montre le schéma de base d'un montage expérimentale couramment utilisé dans toutes expériences électrochimiques [87].

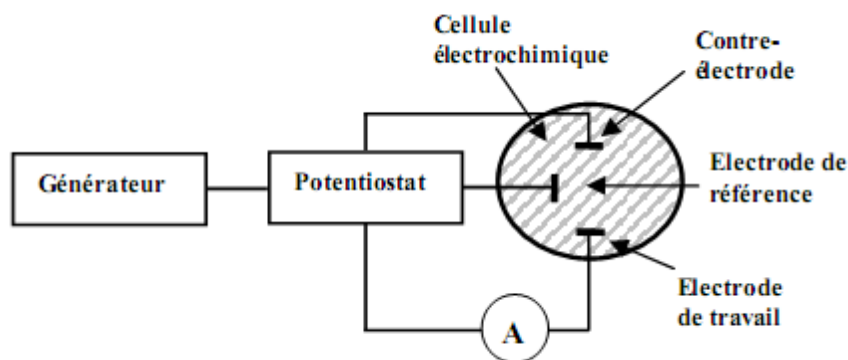


Figure (III.7): Schéma du dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé[87].

III.3.2.4. Etude de l'activité antioxydante du grenadier :

✓ Principe

Le principe de cette étude est basé sur l'obtention de la valeur de la concentration équivalente de l'acide gualique C_{eq} en mg/ml à partir de la densité du courant d'extrait correspondant à cette concentration en g/ml. Cette valeur nous permet d'évaluer l'activité antioxydante de chaque extrait par un simple calcul et le résultat sera exprimé en milligrammes par millilitre.

✓ Mode opératoire

Les trois électrodes contenu dans une cellule électrochimique connectée à un circuit électronique, appelé potentiostat voltalab 40. L'interface est pilotée par un microordinateur.

Les solutions électrolytiques sont constituées d'ions phosphates (dihydrogénophosphate sodium et hydrogénophosphate de disodium) à la concentration de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ et à pH égale à 7,15. Avant chaque mesure, les solutions sont désaérées par barbotage d'azote pendant quelques minutes, puis un flux d'azote est maintenu à la surface de la solution et entre chaque expérience et autre, un nettoyage systématique de l'électrode de travail est réalisé. Il consiste à polir la surface de l'électrode avec du papier abrasif. Après rinçage à l'eau distillée, l'électrode est immergée dans la solution qui y comprend l'extrait à analyser. La manipulation électrochimique est réalisée à température ambiante.

Chapitre IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION



IV. Résultats et discussion :

IV.1. Rendement d'extraction:

Les rendements des extractions sont calculés suivant la formule ci-dessous:

$$Rdt (\%) = \frac{M_{\text{extrait}}}{M_{\text{échantillon}}} * 100 \dots\dots\dots (IV.1)$$

Avec : M_{extrait} = masse de l'extrait en gramme.

$M_{\text{échantillon}}$ = masse de l'échantillon en gramme ($M_{\text{échantillon}} = 30\text{g}$).

Les rendements d'extraction des différents échantillons de grenadier sont reportés dans le tableau(IV .1) et représentés par la figure (IV.1).

Tableau (IV.1): Les rendements des extraits bruts.

Méthode	Echantillon	M_{extrait} (g)	$Rdt(\%)$
Macéraion	Fruit entier	4.2497	14.16
	Écorce	5.1525	17.17
	Grain	3.7648	12.54

Les résultats montrent que l'extrait brut d'écorce a donné les meilleurs rendements d'extraction (17.17 %), suivi par l'extrait brut du fruit entier (14.16 %) et (12.54%) pour les grains.

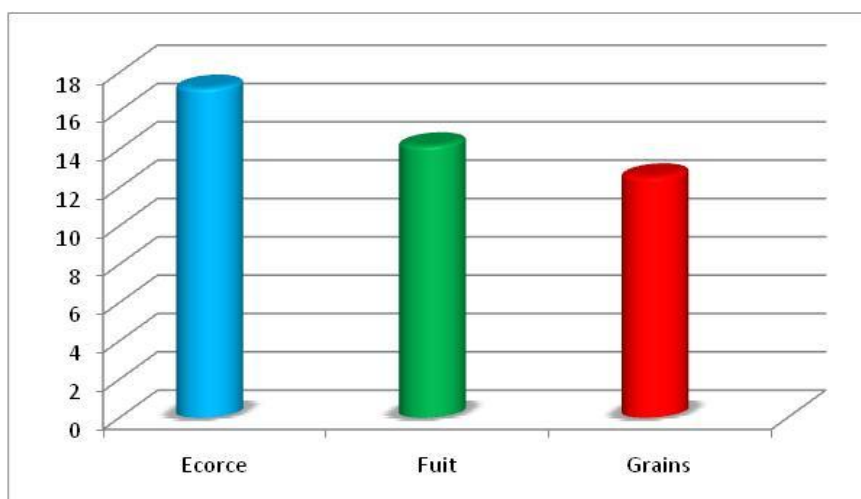


Figure (IV.1) : Rendement d'extraction

IV.2. Etude quantitative des extraits

IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux(PPT):

La courbe d'étalonnage qui est représenté par la figure (IV.2) a été réalisée à l'aide de différentes valeurs des concentrations de l'acide gallique, et leurs absorbances correspondantes.

L'équation de la courbe d'étalonnage :

$$Y = 9,406X + 0,044 \dots\dots (IV.2)$$

Avec :

y : valeur d'absorbance.

x : concentration d'étalon en mg/ml.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait).

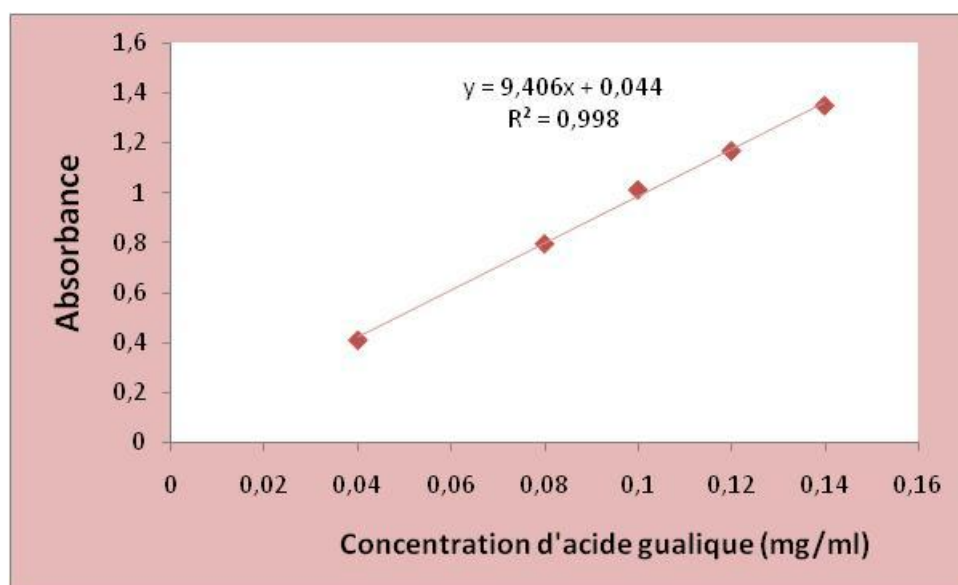


Figure (IV.2) : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Le tableau (IV.2) rassemble les résultats obtenus pour des teneurs en polyphénols totaux des extraits bruts des échantillons (figure IV.3).

Tableau (IV.2) : Teneurs en polyphénols totaux des extraits.

Extrait	Teneur en polyphenols totaux (mgGAE/g d'extrait)
Fruit entier	113,048 ± 1,97
Écorce	286,105 ± 7,84
Grain	71,939 ± 10,12

La figure (IV.3) montre que la teneur en polyphénols totaux des différents extraits est variable, et diffère d'un extrait à un autre. L'extrait des écorces a présenté la plus grande teneur en composés phénoliques 286,105 ± 7,84 mg EAG/g, suivi par l'extrait du fruit entier qui a présenté la teneur 113,048± 1,97 mg EAG/g, il renferme moins de polyphénols que l'extrait des écorces. La teneur en polyphénols totaux la plus faible revient à l'extrait des grains (71,939 ± 10,12 mg EAG/g).

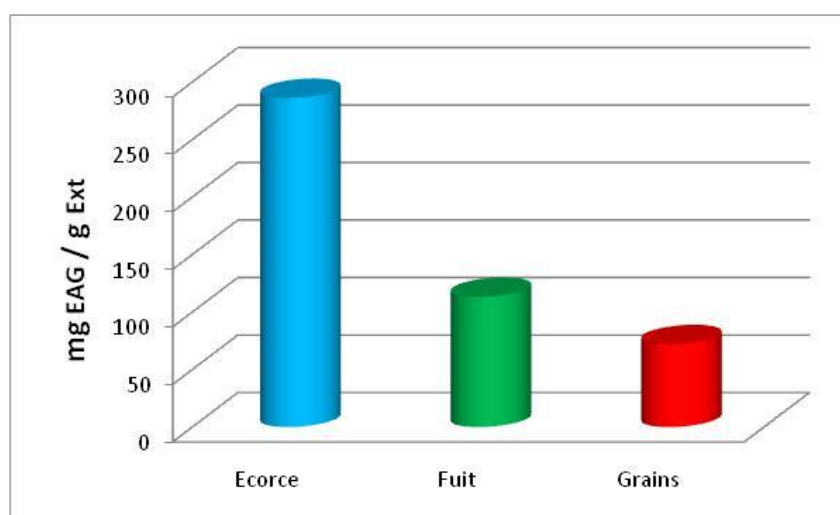


Figure (IV.3) : Teneurs des polyphénols totaux des extraits

IV.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT):

Les teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits ont été estimées par la méthode en utilisant le réactif AlCl_3 . La spectrophotométrie UV-Vis a permis de quantifier les flavonoïdes totaux dans les extraits des plantes étudiées.

La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant les différentes concentrations de la rutine (Figure (IV.4)).

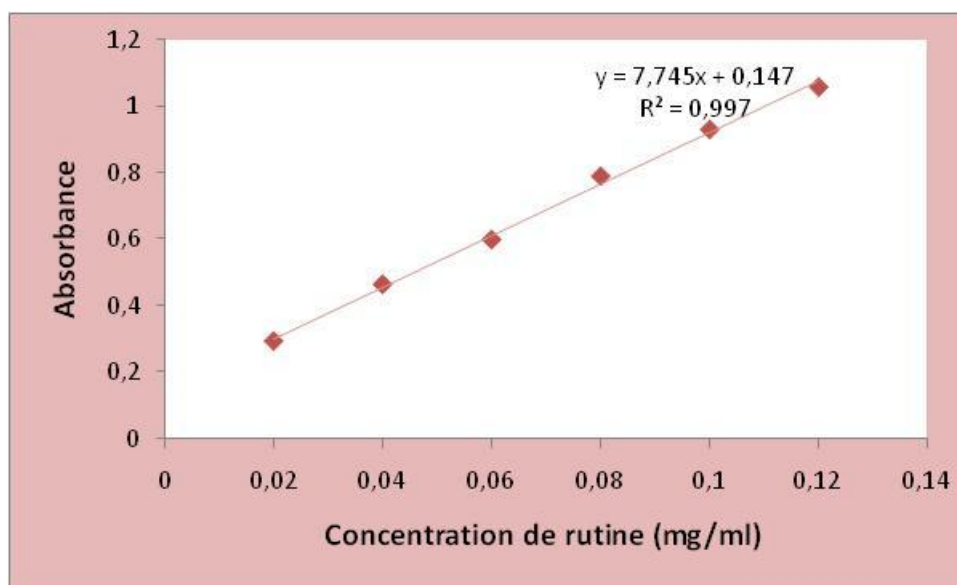


Figure (IV.4): Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Les résultats sont reportés dans le Tableau (IV.3) et représentés par la figure (IV.5) la teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme d'équivalent de rutine par un gramme d'extrait (mg ER/ g). La teneur en flavonoïdes totaux est variable et diffère d'un extrait à un autre.

Tableau (IV.3) : Teneurs des flavonoïdes totaux des extraits.

Extrait	Teneur en flavonoïdes totaux (mg ER/ g d'extrait)
Fruit entier	20,701 ± 0,26
Écorce	112,631 ± 2,75
Grains	-

Les résultats indiquent que l'extrait des écorces, comparé aux deux autres extraits, présente aussi la teneur la plus élevée en flavonoïdes qui est de $112,631 \pm 2,75$ mg ER/ g.

La teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait du fruit entier est de $20,701 \pm 0,26$ mg ER/ g d'extrait. D'après les résultats trouvés, l'extrait des grains ne contient pas de flavonoïdes.

En comparant les teneurs en flavonoïdes totaux à celles des composés phénoliques totaux dans tous les extraits, nous remarquons qu'elles sont toutes plus faibles, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques (acides phénoliques, tanins...).

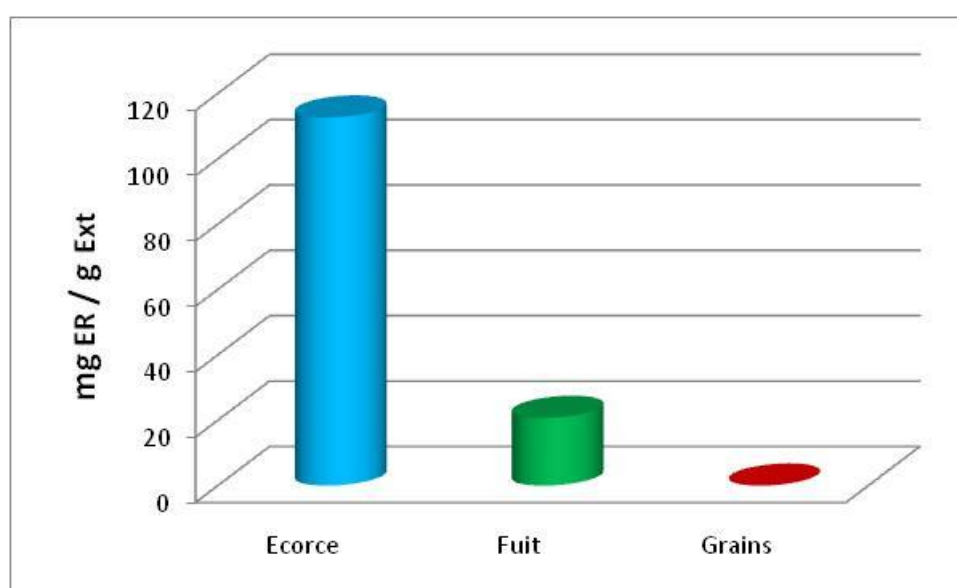


Figure (IV.5) : Teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits

IV.2.3. Dosage des flavanols totaux (FLA) :

La quercétine a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, c'est un flavonoïde très connu de la famille des flavanols, la teneur en flavanols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

Les taux des flavanols totaux dans les extraits ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage de quercétine (Figure IV.6).

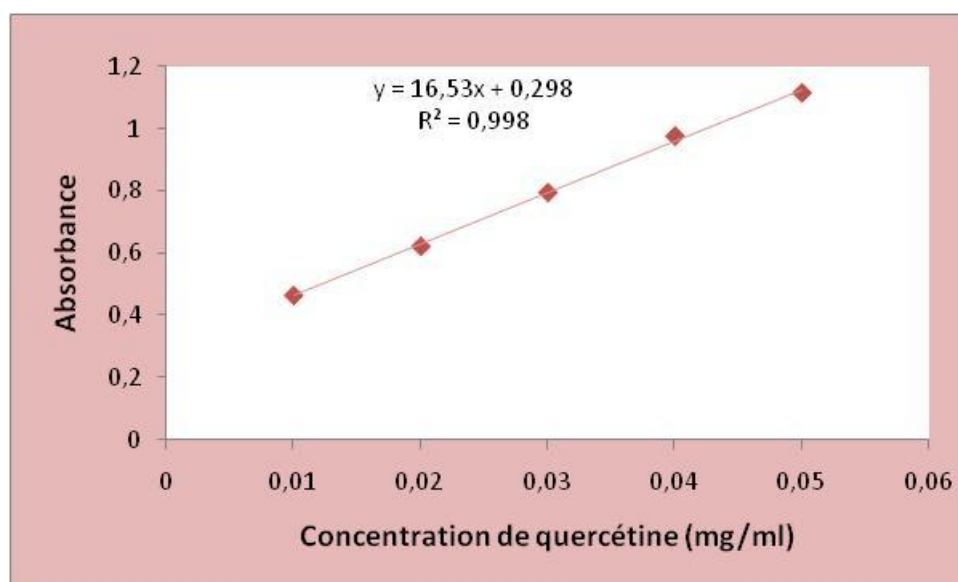


Figure (IV.6) : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavanols totaux.

Le tableau(IV.4) renferme les teneurs des flavanols totaux dans les différents extraits

Tableau (IV.4) : Teneurs des flavanols totaux dans les extraits

Extrait	Teneur en flavanols totaux (mg EQ/ g d'extrait)
Fruit entier	3,262 ± 0.105
Écorce	11,736 ± 0.32
Grain	-

La figure (IV.7) montre que l'extrait d'écorce du grenadier possède la teneur en flavanols totaux la plus élevée ($11,736 \pm 0.32$ mg EQ/ g d'extrait), suivi par l'extrait du fruit entier ($3,262 \pm 0.105$ mg EQ/ g d'extrait). L'extrait des grains n'a montré aucune teneur en flavanols totaux.

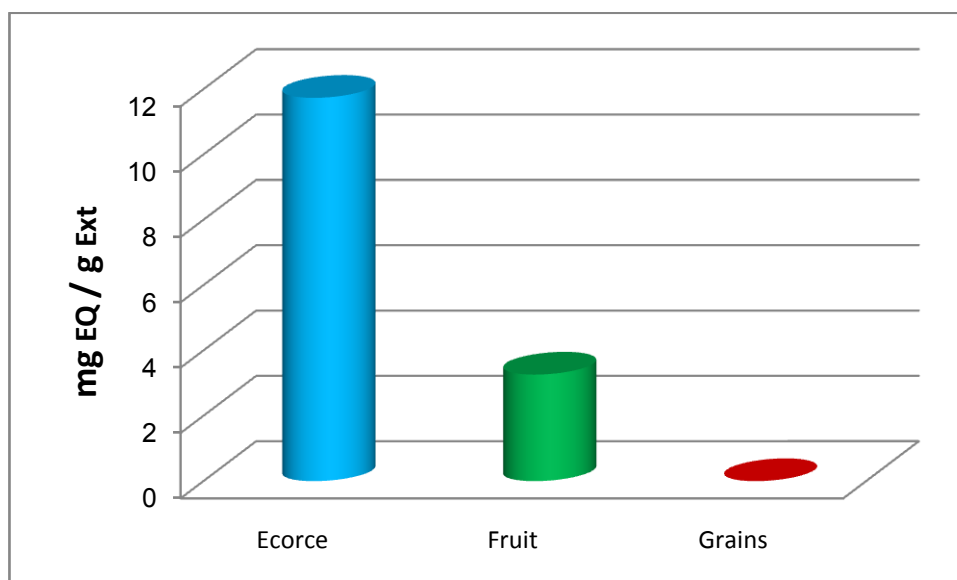


Figure (IV.7): Teneurs en flavanols totaux dans les extraits.

IV.2.4. Comparaison entre les différents extraits en composition phénoliques:

La figure (IV.8) représente quantification de la composition totale en polyphénols, flavonoïdes et flavanols, dans les différents extraits (fruit entier, écorce et grains).

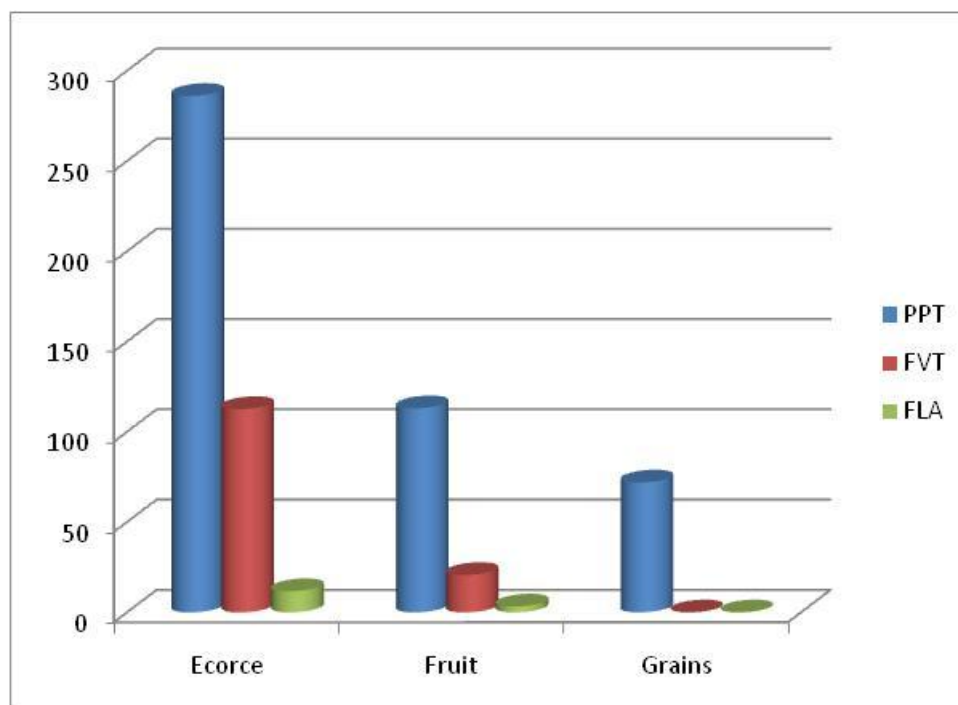


Figure (IV.8): polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavanols totaux dans les extraits fruits entier, écorce et grains.

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits montrent que les teneurs des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des flavanols totaux sont variable dans chaque extrait. La majorité des polyphénols des grenadiers se concentrent dans les écorces, c'est-à-dire que les écorces des grenadiers contiennent plus de composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et flavanols) que les grains des fruits et que les fruits entiers.

IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante

IV.3.1. Méthode chimique : Test du radical libre DPPH

L'activité anti radicalaire est calculée par la méthode du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), cette méthode est fréquemment utilisée pour sa simplicité. Elle est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés [80].

Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical. Le paramètre IC_{50} représente la concentration équivalente à 50% de DPPH perdu. Les résultats exprimés en IC_{50} qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC_{50} est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande [81].

Les résultats sont résumés dans le Tableau (IV.5).

Tableau (IV.5): Valeurs des IC_{50} du DPPH pour les extraits.

Extrait	Equation	IC_{50} (mg/ml)
Fruit entier	$Y=670.0 x + 34.98$	0,022
Écorce	$Y=3352.0 x + 26.70$	0.0069
Grains	$Y=67.16 x + 41.10$	0,1325

La figure (IV.9) montre que les valeurs des IC_{50} sont extrêmement différentes. L'extrait des écorces présente le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (0.0069 mg/ml), suivi par les deux autres extraits des fruits entiers (0,022 mg/ml) et des grains (0,1325 mg/ml).

Le fruit du grenadier qui contient une quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes peut jouer un rôle majeur dans l'inhibition antioxydante.

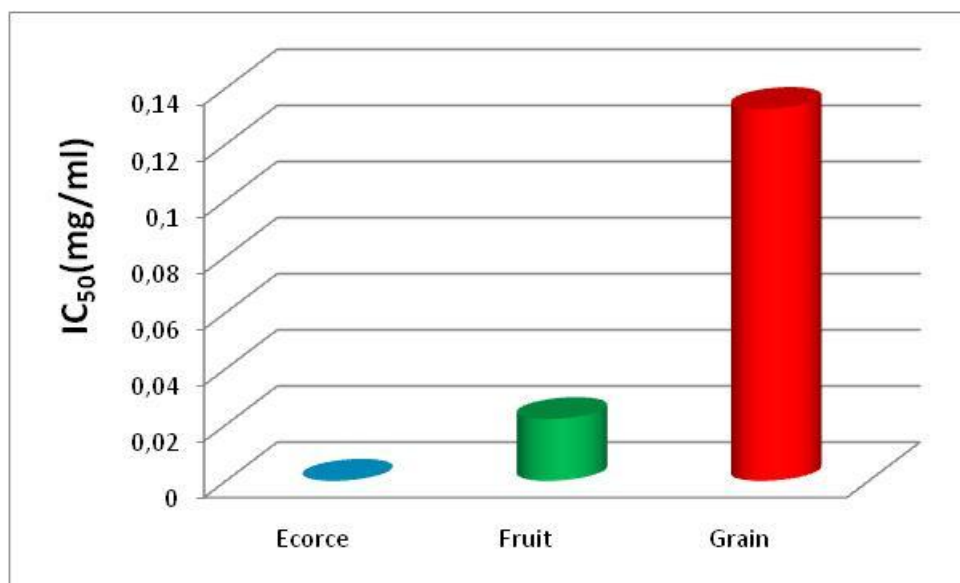


Figure (IV.9): comparaison entre IC₅₀ dans les différents extrais.

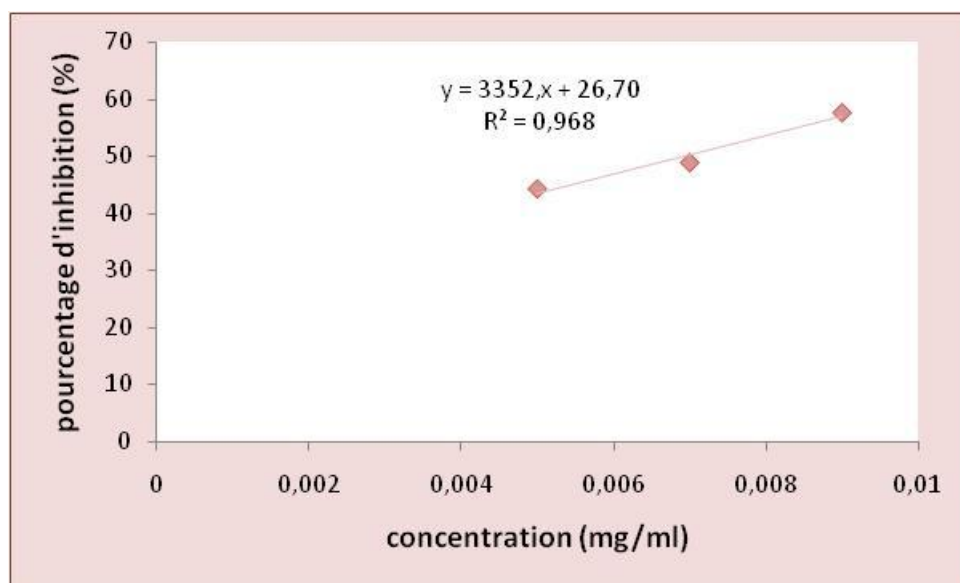


Figure (IV.10) : Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait des écorces.

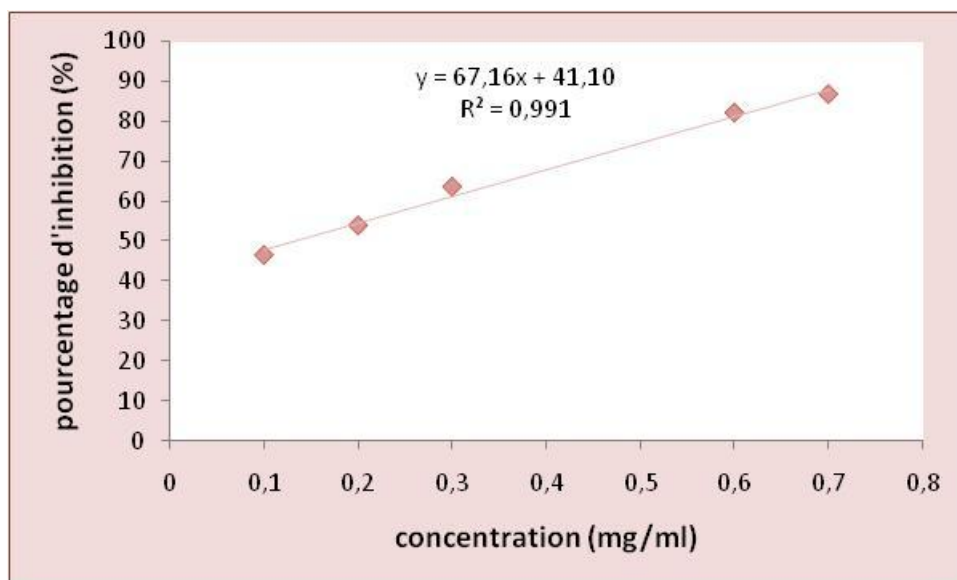


Figure (IV.11) : Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait des grains.

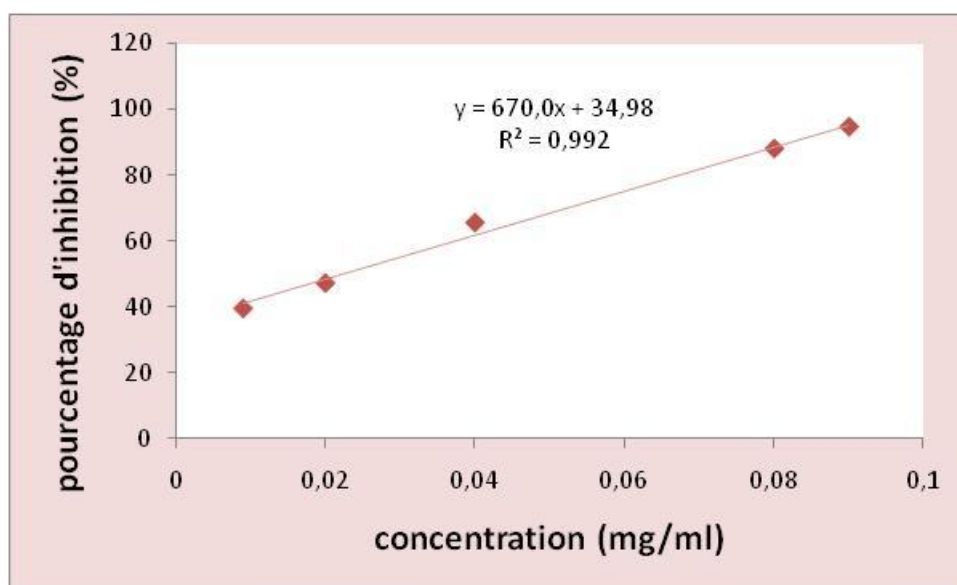


Figure (IV.12) : Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait du fruit entier.

IV.3.2. Méthode électrochimique : Voltampérométrie cyclique

IV.3.2. 1. Etude électrochimique du comportement de l'électrolyte

Avant de commencer notre étude électrochimique, on commence tout d'abord par l'étude du comportement de la solution électrolytique, pour être sûr que cette solution transporte uniquement le courant et n'exerce aucun effet sur les solutions des échantillons (figure (IV.13)). La solution électrolytique est constituée d'un mélange de dihydrogénophosphate de potassium et du hydrogénophosphate de dipotassium (solution tampon), de concentration de $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ et à $\text{pH}=7,15$. Nous avons utilisé les conditions opératoires : domaine de potentiel est -200 jusqu'à 1400 mV , vitesse de balayage 100 mV.S^{-1} .

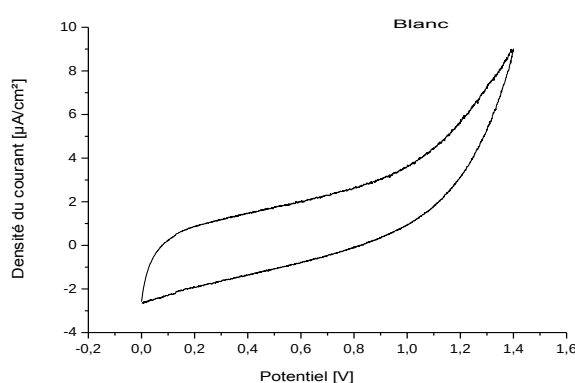


Figure (IV.13): Comportement de l'électrolyte ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$).

IV.3.2. 2. Etude électrochimique du comportement de l'acide gallique

L'étude électrochimique du comportement du standard utilisé qui est l'acide gallique est effectuée dans l'intervalle de concentration allant de $0,5 \text{ g/l}$ à $1,2 \text{ g/l}$ dans le domaine d'électroactivité des polyphénols jusqu'à l'obtention de courbes intensité-potentiel reproductibles et présentant une allure caractéristique.

On obtient les voltampérogrammes représentés dans la figure (IV.14) pour les différentes concentrations de l'acide gallique.

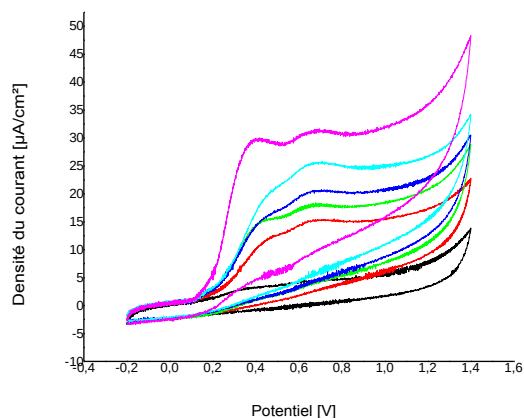


Figure (IV.14): Voltampérogrammes cycliques pour les différentes concentrations de l'acide gallique.

La figure (IV.14) montre que pour une graduation croissante et de façon régulière de la concentration de l'acide gallique (à partir de 0,5 g/l jusqu'à 1,2 g/l) dans la cellule, on obtient des voltampérogrammes cycliques avec des surfaces et des densités de courants régulièrement croissantes aussi.

IV.3.2. 3. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Après avoir représenté les différents voltampérogrammes cycliques pour un graduant de concentrations différentes, on peut représenter la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure (IV.15)) en prenant la densité du courant anodique en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ en fonction de la concentration g/l (tableau (IV.6)).

Tableau (IV. 6): Valeurs des densités du courant en fonction de la concentration de l'acide gallique

C (g/l)	I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
0.5	15,43
0.6	18,008
0.7	20,14
0.9	25,53
1.2	30,44

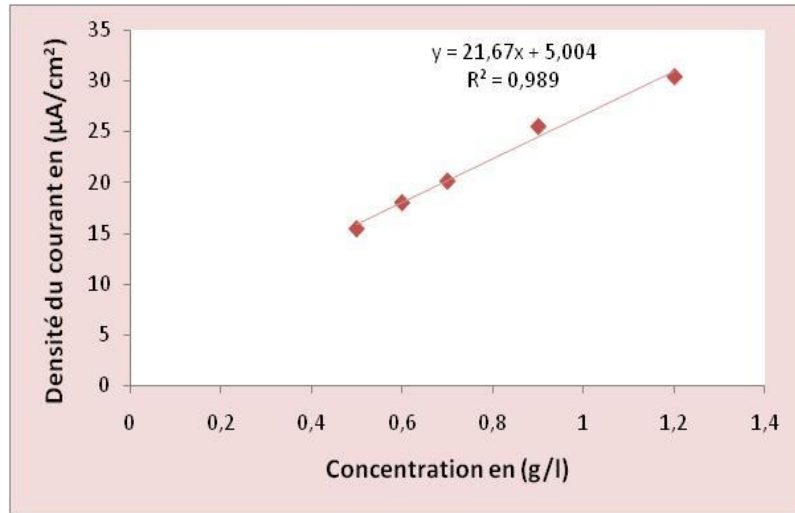


Figure (IV.15): Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

IV.3.2. 4.Evaluation de l'activité antioxydante totale (AAT)

L'équation obtenue d'après la courbe linéaire de l'acide gallique est : $y = 21,67x + 5,004$, d'où y représente la valeur de la densité anodique du courant et x représente la valeur de la concentration standard en g.l^{-1} . En remplaçant à chaque fois la valeur de la densité du courant dans l'équation précédente, on trouve la valeur de la concentration équivalente en acide gallique $C_{\text{éq}}$ (g/l).

Pour calculer la concentration de chaque extrait, on divise donc la masse de l'extrait obtenue après extraction sur le volume du solvant dans lequel on a dissout cet extrait, La concentration massique d'échantillon C_1 en g/mL comme le montre la relation suivante :

$$C_1 \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{m_{\text{extrait}}}{V} \quad \dots \dots (IV. 3)$$

Pour un volume de l'extrait V_{inj} injecté dans la cellule électrochimique, donc la masse (m'_{extrait}) correspondante est :

$$m'_{\text{extrait}} = V_{\text{inj}} * C_1 \quad \dots \dots (IV.4)$$

Volume total dans la cellule (ml) :

$$V_T = V_{\text{électrolyte}} + V_{\text{inj}} \quad \dots \dots (IV. 5)$$

Donc la concentration de l'extrait (C_1') dans la cellule :

$$C_1' \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{m'_{\text{extrait}}}{V_T} \quad \dots \dots (IV. 6)$$

D'où l'activité antioxydante totale (**AAT**) est calculée à partir de la relation

$$AAT \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{C_{eq} \left(\frac{g}{l} \right)}{C'_1 \left(\frac{g}{ml} \right)} \dots \dots (IV. 7)$$

IV.3.2. 5. Voltampérogrammes cycliques des échantillons

De la même façon et sous les mêmes conditions précédentes appliquées sur l'acide gallique, on traite les différentes fractions de tous les échantillons du grenadier. On obtient les voltampérogrammes cycliques ci-dessous.

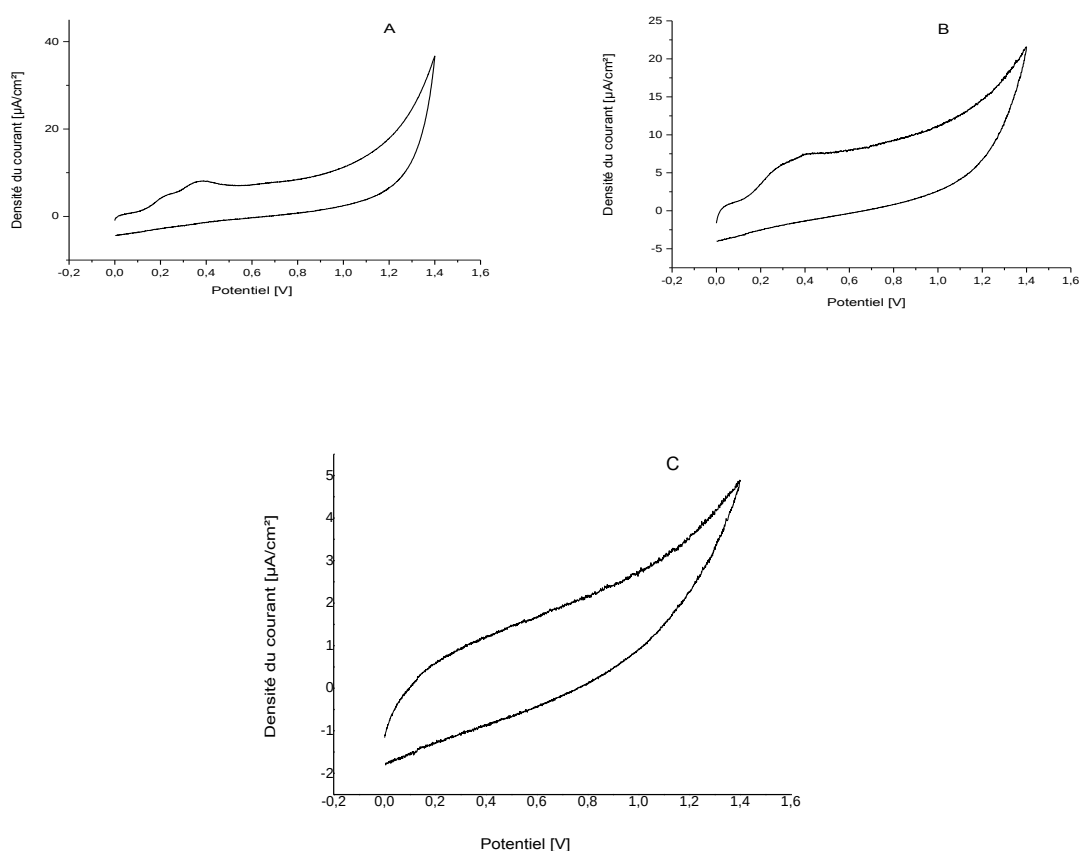


Figure (IV.16): Voltampérogrammes cycliques des échantillons

(A) fruit entier, (B) écorces et (C) grains

A. Paramètres électrochimiques

Les paramètres électrochimiques des échantillons étudiés du grenadier sont rassemblés dans le tableau ci-dessous:

Tableau (IV. 7): Paramètres électrochimiques des échantillons du grenadier.

Echantillon	C (g/ml)	$I_{p,a}$ ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	$E_{p,a}$ (mV)
Fruit entier	0.21×10^{-3}	8.194	0.374
Ecorce	0.18×10^{-3}	7.622	0.399
Grains	3×10^{-3}	-	-

Les valeurs des densités des courants anodiques représentent l'oxydation des composés phénoliques contenus dans les différents extraits du grenadier.

B. Interprétation des résultats

La principale caractéristique de tous les composés phénoliques est la suivante : ils contiennent un ou plusieurs groupes hydroxyles fixés sur un cycle benzénique. Il est généralement admis que la première étape d'oxydation des composés phénoliques conduit à la formation d'un ion phenoxonium ou principalement à un radical phénoxy. Ces produits peuvent réagir dans d'autres réactions chimiques.

Le tableau (IV. 8) rassemble les valeurs des activités antioxydantes totales calculées par la formule (IV.7) des différents extraits du grenadier.

Tableau (IV. 8): Activités antioxydantes totales des différents échantillons du grenadier.

Echantillon	Activité antioxydante totale (mg/g)
Fruit entier	666.66
Ecorce	570.09
Grains	-

Ces résultats sont représentés par la figure (IV.17). On remarque que l'extrait du fruit entier (666.66 mg/g) et l'extrait des écorces (570.09 mg/g) possèdent des activités antioxydantes importantes, mais l'extrait des grains n'a montré aucune activité antioxydante dans l'intervalle

étudié, et en utilisant l'acide gallique comme standard, cela peut être expliqué par la présence d'autres groupes de composés phénoliques, puisque l'extrait des grains contient des polyphénols.

Ces résultats peuvent être expliqués du fait que la quantité et la qualité des composés phénoliques contenus dans le fruit du grenadier, les écorces et les grains est variable de l'une par rapport à l'autre.

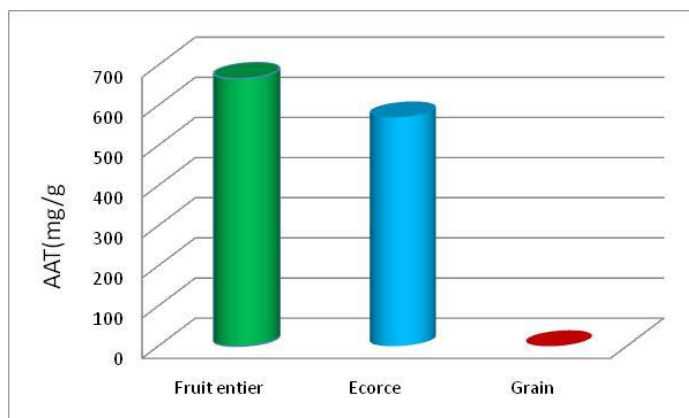


Figure (IV.17) : Activité antioxydante totale des différents extraits

CONCLUSION GÉNÉRALE



Conclusion Générale

Le présent travail avait pour objectif d'étudier l'activité antioxydante totale du fruit du grenadier, ainsi que la quantification de la composition chimique en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavanols totaux. On a étudié trois échantillons du fruit grenadier de la région d'El Oued dans son état frais qui sont : fruit entier, grains et écorces. L'extraction du matériel végétal a été réalisée par macération avec de solvant (éthanol+ eau).

En premier lieu nous nous sommes intéressés à quantifier les composés phénoliques par la spectrophotométrie UV-visible. Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que l'extrait des écorces est l'extrait le plus riche en polyphénols, suivi par l'extrait du fruit entier et enfin les grains, avec les valeurs respectives suivantes : $(286,105 \pm 7,84 \text{ mg EAG/g})$, $(113,048 \pm 1,97 \text{ mg EAG/g})$ et $(71,939 \pm 10,12 \text{ mg EAG/g})$.

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes totaux par la méthode au chlorure d'aluminium et le dosage quantitatif des flavanols totaux par la méthode au chlorure d'aluminium avec d'acétate de sodium montrent que l'extrait des écorces présente aussi la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux $(112,631 \pm 2,75 \text{ mg ER/g})$ et en flavanols totaux $(11,736 \pm 0,32 \text{ mg EQ/g d'extrait})$ par rapport au fruit entier. L'extrait des grains n'a montré aucune teneur en flavonoïdes totaux et en flavanols totaux.

Enfin, dans ce travail on a évalué l'activité antioxydante des extraits qui a été estimée par deux méthodes, qui sont la méthode chimique qui repose sur le piégeage du radical libre DPPH et la méthode électrochimique qui repose sur la technique de la voltampérométrie cyclique. Pour le test du radical libre DPPH, les résultats ont montré que la valeur la plus élevée revient à l'extrait des écorces $(0,0069 \text{ mg/ml})$. Pour la méthode électrochimique utilisée, les résultats ont montré que l'extrait des écorces aussi et l'extrait du fruit entier possèdent des activités antioxydantes importantes respectivement avec les valeurs $(666,66 \text{ mg/g})$ et $(570,09 \text{ mg/g})$.

Les résultats de cette étude ont montré que le fruit du grenadier qui contient une quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes peut jouer un rôle majeur dans l'activité antioxydante et ont indiqué que ce fruit peut être utilisé comme source naturelle d'antioxydants.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

- [1] **Bahorun, T.(1997).** Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius , p 83.
- [2] **Boizot, N. Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieuxforestiens, prairiaux et aquatiques, INRA, 79-82.
- [3] **Hirasa, K. Takemasa, M.(1998).** Spice science and technology. New York: Marcel Dekker.
- [4] **Kabouc, A. (2005).** Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse Doctorat, Université Mentouri-Constantine, p2.
- [5] **Afaq, F. Saleem, M. Krueger, C.G.Reed, JD et Mukhtar ,H.(2005).** Anthocyanin- and hydrolysable tannin-richpomegranate fruit extractmodulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Jan 2005;113(3):423-33.
- [6] **Wald, E. (2009).** Le grenadier *Punicagranatum*: Plante historique et evolution thérapeutique récentes. Université Henri Poincare.Thèse.158p
- [7] **QA international collectif. (1996).** L'encyclopédie visuelle des aliments .livre. Quebec-Amerique (EDS),Singapour, 685p.
- [8] **Calin, S. A et Carboneli, B, A.2005.** La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p .
- [9] **Benoit Bock.(2013).** Tela Botanica : Base de donnés Nomenclature de la flore en France. BDNFF, 4p.
- [10] **Ben Abdennebi, M. A .(2012).** Le grenadier tunisien (*Punicagranatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK. Mémoire., Fac. Med. Tunis, 82p.

- [11] **Spichiger ,R.E et Savolainen ,V.(2005).** Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales (Troisième édition). Presses polytechniques et universitaires romandes (EDS), 413 p.
- [12] **Sarkhosh, A. Zamani. Z. Fatahi, R. Ebadi, A. (2006).** RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punicagranatum L.*) genotypes. *Sci. Hortic.* 111(1), 24-29.
- [13] **Melgarejo, P.(1993).** Selección y tipificación varietal de granado (*Punicagranatum L.*) [Ph.D. thesis] Valencia, Spain: Univ. Politécnica de Valencia (UPV).
- [14] **Flora von Deutschland, O.W.T. Schweiz, O.U.D. (1885).** Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera, Germany.
- [15] **Wald, E. (2009).** Le grenadier *Punicagranatum* : Plante historique et évolution thérapeutique récentes. Université Henri Poincaré. Thèse. 158p.
- [16] **Cazin ,F.J.(1868).** Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées. De l'envol (EDS) 1189 p.
- [17] **Garnier, G et Bezanger-Bauquesne, L.(1961).** Ressources médicinales de la flore française. Tome II. Vigot Frères (EDS). 1511p.
- [18] **Paris ,R.R. Moysz, H. (1981).** Matière médicale. Collection de précis de pharmacie. 2^e édition. Tome II. Masson (EDS), 518 p
- [19] **Lanskye ,P. Newman , R. A.(2007).** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*. N°109. 206p.
- [20] **Fournier, P.(1948).** Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tome II. Paul Lechevalier (EDS), 504 p.
- [21] **Curtay, J.P. Jacob, L. Jung, R.R. & Kaplan, M. (2008).** Jus de grenade fermenté, la grenade, "aliment-plus" un nouvel outil puissamment cardiovasculaire et anti-cancer dans l'arsenal de la nutrithérapie. Macro piéteur (EDS), Paris, 73p.
- [22] **Basu ,A. Penugonda , K.(2009).** Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev.* 67(1):49-56.

- [23] **Seeram ,N.P. Lee, R. Heber, D. (2004).** Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punicagranatum L.*) juice. *Clin Chim Acta*;348(1-2):63-8.
- [24] **Schubert, S.Y. Lansky, E.P. Neeman ,I.(1999).**Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*;66(1):11-7.
- [25] **Albrecht, M. Jiang. W Kumi-Diaka ,J. Lansky, E.P.Gommersall ,L.M .et Patel ,A.(2004).** Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food. Fall*;7(3):274-83.
- [26] **Malik .A. Afaq ,F. Sarfaraz ,S. Adhami, V.M. Syed ,D.N .Mukhtar ,H.(2005).** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;102(41):14813-8.
- [27] **Pantuck ,A.J. Leppert. J.T.Zomorodian, N. Aronson , W.Hong ,J. et Barnard .RJ. (2006).** Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res*;12(13):4018-26.
- [28] **Esmailzadeh ,A. Tahbaz, F. Gaieni, I. Alavi-Majd ,H.Azadbakht ,L. (2006).** Cholesterol lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Int J Vitam Nutr Res*;76(3):147-51.
- [29] **Rosenblat , M. Hayek T, Aviram M. (2006).** Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis.* Aug;187(2):363-71.
- [30] **Prashanth ,D et Asha, M.K.(2001).** Antibacterial activity of *Punicagranatum*. *Fitoterapia.* 2001. N°72. Pages 171-173.
- [31] **Championnière J. L.(1850).** *Journal de médecine et de chirurgie pratique: à l'usage des médecins praticiens.* Imprimerie de Crapelet (EDS), Paris, 21p.
- [32] **Ajaikumar ,KB Et al.(2005).** The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum L.* (pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol.* 4;96(1-2):171-6.

- [33] **Murphy, K.N.(2004).** Study on wound healing activity of *Punicagranatum* peel. *J Med Food*. 2004 Summer;7(2):256-9.
- [34] **Geneviene ,M.(2012).***Se soigner avec les jus frais selon l'Ayreda. Revue électronique n°143. Alternative (EDS), 3p.*
- [35] **Mompon, B. Lemaire, B. Mengal ,P. et Surbel, D. (1996).** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. IN « Polyphénols 96 ». Ed INRA. 31-35.
- [36] **He,Z .Xia ,W. et Chen ,J. (2008).** Isolation and structure elucidation of phenolic compounds in Chinese olive (*Cnarium album* L.) fruit. *European Food Research and Technology*. 226: 1191-1196.
- [37] **Richter, G. (1993).** Composés phénoliques in *Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie*. Ed Presse polytechnique et universitaire romande. pp: 317-339.
- [38] **Macheix ,J. J .Fleuriet, A et Jay–Allemand , C . (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- [39] **Druzyńska ,B. Stepniewska ,A. et Wolosiak, R. (2007).** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 6: 27-36.
- [40] **Bruneton ,J. (1999).** *Phytochimie. Plantes médicinales. Pharmacognosie. 3ème édition*, Paris, France. pp : 125-165.
- [41] **Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99 : 191–203.
- [42] **Urquiaga,I. N. E. S. and Leighton, F. E. D. E. (2000)** .Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res*. 33: 55-64.
- [43] **Bessas .A, Benmoussa. L, Kerarma. M ,(2008),** " Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien ."Mémoire de fin d'étude .
- [44] **Laraoui,H . (2007).** docteur de l'université Louis pasteur "Etude Phytochimique l'Extrait Chloroformique de *Bupleurum Atlanticum*. Université El Hadj Lakhdar Batna.

[45] **D'Archivio ,M. Filesi ,C. Di Benedetto ,R. Gargiulo , R. Giovannini ,C. et Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità*. 43(4) : 348-361.

[46] **Long ,H.S. Tilney, P.M. et Van Wyk B.-E. (2010).** The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea subsp. africana* (Oleaceae). *South African Journal of Botany*. 76 (02): 167-420

[47] **Salunkhe, D.K. Chavan, J.K., Kadam, S.S.(1990).** Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton. Florida: CRC press. Pp 113-146.

[48] **Thompson ,J. C et Mottola, H. A. (1984)** .Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. *Analytical Chemistry* . 56(4): 755-757.

[49] **Harrar ,A .N. (2012)** .*Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L.* Thèse de magister ,Université Ferhat Abbas-Setif,P 14.

[50] **Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V.(2006)** .Les polyphénols en agroalimentaire.. Ed Lavoisier. p2- 10.

[51] **Guignard, J. (2001)** .*Botanique systématique moléculaire"*, 2ème édition Lavoisier, Paris. p.122

[52] **W –Erdman ,J. Balentine, J. D. Arab ,L. Beecher, G .Dwyer , J. T.Folts J. Harnly, Hollman ,J. P. L –Keen,C. Mazza ,G. Messina ,M. Scalbert , A. Vita J .Williamson ,G et Burrowes ,J . (2007)** .*Flavonoids and hearthealth : Proceeding of the ILSI North America flavonoids. workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. Journal of Nutrition.*, 137 (3 supp 1) : 718 s- 737 s.

[53] **Emerenciano ,V. P. Barbosa ,K. O. Scotti ,M. T et Ferrero, M. J. P (2007).** Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of Brazilian chemical society*. 18 (5) : 891-899.

[54] **Narayana, K. R. Reddy ,M. S .Chaluvadi ,M. R et Krishna, D. R .(2001)** .Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.*, 33 : 2-16. [55] **Malešev, D et Kuntić , V.(2007)** .Investigation of metal-

flavonoidchelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions." *Journal of the Serbian chemical society.*, 72 (10) : 921-939.

[56] **Afanas'eva, I.B. Ostrakhovitch, E.A. Mikhal'chik, E.V. Ibragimova, G.A. Korkina, L.G. (2001).**Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology.*. 61(6): 677-6

[57] **Murota, K. Mitsukuni ,Y. Ichikawa , M. Tsushida ,T. Miyamoto ,S. et Terao ,J. (2004).**Quercetin-4'-glucoside is more potentthan quercetin-3-glucoside in protection of ratintestinal mucosahomogenatesagainstiron ion-inducedlipidper oxidation .*Journal ofAgricultural and Food Chemistry.* 52(7): 1907-1912

[58] **Simic, A. Manojlović, D. Segan , D.et Todorović , M. (2007).**Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidantactivity of naturalphenolics. *Molecules.* 12(10): 2327 2340.

[59]**Kostyuk , V.A . Potapovich, A.I. Kostyuk , T.V. Cherian , M.G.(2007) .**Metal complexes of dietaryflavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity agains toxidative stress in vivo." *Cell. Mol. Biol.* 53: 62–69.

[60] **Kang, J., Su, B., Lu, X. (2005) .**Synthesis and characterization of coordination compounds of Cd (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) with rutin. *Indian journal of chemistry. Sect. A: Inorganic, physical, theoretical et analytical.* 44(10), 2010-2014.

[61] **Guo ,M. Perez, C .Wei ,Y. Rapoza ,E. Su , G. Bou-Abdallah ,F. et Chasteen,ND. (2007).**Iron-bindingproperties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions.*43: 4951–4961.

[62] **De Souza, R.F. Sussuchi E.M. et al .(2003).** Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry.* 33(7): 1125-1144.

[63] **Bellebcir ,L. (2008) .**Etude des composés phénoliques en tan que marqueurs de biodiversité chez les céréales. Thèse de magister Université Mentouri de Constantine , p17 , p 21.

[64] **Mohammed i , Z. (2006) .**Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes la région de Tlemcen. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen.

- [65] **Perrin ,J.L. (1992).** *Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile.* "Revue française des corps gras. N° 39. P 25-32.
- [66] **Harborne, J. B. (1997).** *Recent advances in chemical ecology.* Nat Prod Rep; 14: 83-98.
- [67] **Seigler ,DS. (1998) .**Plant secondary metabolism. Ed. Kluwer Academic, Boston, p.193-205.
- [68] **Ben Abbes ,F .(2011).** *Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « Phoenixdactylifera L..* Thèse de magister Université Ferhat Abbas- Setif ,p 22 – 26.
- [69] **Albert,L. (1998).** *La santé par les fruits.* Ed. Veechi, Paris. p 44-74.
- [70] **Hadi ,M. (2004).** *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractères pro-oxydants ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques.* Mémoire doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg, p 155.
- [71] **Daayf ,F. El Bellaj, M. El Hassni , M. Jaiti ,F and El Hadrami, I.(2003) .**Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenixdactylifera*) callus by *Fusariumoxysporumf.sp. albidnis*. Environ .Experiment. Botany . 49 : 41-47.
- [72] **Lugasi ,A. Hovari, J. Sagi, K. V. and Biro ,L. (2003) .**The role of antioxidant phytonutrient sin the prevention of diseases." Acta Biologica Szegedientsis.1-4: 119-125.
- [73] **Bouhadjra, K. (2011) .**Etude de l'effet des Antioxydants naturels et de Synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive Vierge. Thèse de magister , Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou , p 42.
- [74] **Dacosta, Y. (2003) .**Les phytonutriments bioactifs. 669 références bibliographiques. Ed.Yves Dacosta, Paris, p. 317.
- [75] **Novelli ,G. P. (1997) .**Role of free radicals in septicshock. J. Physiol. Pharmacol ,48: 517-527.
- [76] **Favier, A. (2003) .**Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.. L'Actualité chimique; 108-117.
- [77] **Halliwell , B. (1999) .** How to characterize a biologic a antioxidant. Free Radic Res Commun, 9, 1-32.

- [78] **Boubacar , S. A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *combretum glutinosum* Perr. Ex DC (combretaceae). Université de Bamako .
- [79] **Mogode, D. J.(2005).** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Université de Bamako.
- [80] **Berra, D. (2015).** Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de *Matricaria Pubescens*. Thèse de masters, Université Echahide Hamma Lakhdar EL Oued, p33. P42.
- [81] **Zeghad .N .(2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes édicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Mémoire magister, Université Constantine.
- [82] **Bellebcir, L .(2008) .** Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales " , Thèse de magister, Université Mentouri de Constantine , p35.
- [83] **Bessas, A. (2008).** Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien . Mémoire de Ingénieur d'état Université Djillali Liabes -Sidi Bel Abbes , p51.
- [84] **Belguidoum ,M. (2012) .** Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum* " , Mémoire de masters , Université Kasdi Merbah Ouargla p37.
- [85] **Zarrou, B. (2012) .** Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de la plante *Matricaria pubescens* (Asteracées) et évaluation de leur activité antioxydante , Mémoire de masters, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- [86] **Harrar ,A.N. (2012) .** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L." Thèse de magister ,Université Ferhat Abbas-Setif.
- [87] **Boubekri, Ch. (2014),** " Etude de l ' activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques". Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider - Biskra, p79, p93, p95 .

[88] **Hemmami, H et Guezei, N . (2013)** .*Évaluation de l'activité antioxydante d'extraits de Capsicum annuum L de la région d'el-oued "*Thèse de masters, Université Echahide Hamma Lakhdar EL Oued.