



الجمهورية الديمقراطية الشعبية الجزائرية
REPUBLIC ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
LE MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عبد الحميد ابن باديس مستغانم
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Laboratoire de Pharmacognosie et Api-phytothérapie

Thèse de Doctorat 3^{ème} Cycle (LMD)
Filière : Science Biologique
Option : Plantes Médicinales et Phytothérapie

Présentée par :

M^{me} DOUAOURI Nor El Houda

THÈME

Contribution à une étude phytothérapeutique, anti-inflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum* L.) – Etude in vivo

Soutenu publiquement le 21/06/2018

Devant le jury :

Président de jury	: Pr. LOTMANI Ibrahim	Université de Mostaganem
Directeur de thèse	: Pr. DJEBLI Noureddine	Université de Mostaganem
Examinatrice	: Pr. ATIK BEKKARA Fawzia	Université de Tlemcen
Examinatrice	: Pr. BELARBI Meriem	Université de Tlemcen
Examinatrice	: Pr. HAMMADI Khaira	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2017- 2018

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à mon directeur de thèse, Professeur Djebli Nouredine. Je le remercie vivement de m'avoir confié ce sujet, fait confiance, de m'avoir soutenu et surtout encouragé durant tout le long de ce travail. Son dynamisme, sa disponibilité, son aide, ses précieux conseils, ses connaissances scientifiques m'ont permis d'avancer dans mes recherches. Je vous remercie, tout particulièrement, pour vos grandes qualités humaines.

Mes sincères remerciements s'adressent au président du jury, Professeur Lothmani Brahim, de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Que Madame le Professeur Atik Bakkara Fawzia, ainsi que Madame le Professeur Belarbi Meriem de l'Université de Tlemcen, reçoivent mes sincères remerciements pour avoir accepté de rapporter et de juger mon travail. Je vous transmets ma profonde gratitude pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce document ainsi que pour vos remarques lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier également, Madame le Professeur Hamadi Khaira, pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Vos conseils et suggestions, tant scientifique et techniques, seront de grande valeur à ce travail.

Je remercie aussi le Professeur Vincenzo De Feo pour son accueil et sa disponibilité au sein de son laboratoire de Biologie végétale, Faculté de Pharmacie, Université de Salerno, Italie.

Ce travail n'aurait pu être mené sans l'aide précieuse de Madame Boubekour Sihem, chef de département de chimie organique du Centre de Recherche et de Développement (CRD), Sidal. Qu'elle trouve ici mes vives reconnaissances et mes remerciements les plus profonds.

J'exprime aussi ma reconnaissance à Docteur Azine Kenza, Chef de département de Pharmaco-toxicologie, Centre de Recherche et de Développement (CRD), Sidal.

A Monsieur Boudjlal et Madame Ounadi du laboratoire de recherche de *Conservation et Valorisation des Ressources Marines* (CVRM), Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et aménagement du littoral (ENSSMAL), vont mes remerciements pour leur précieux aide afin de réaliser une étape importante de ce travail.

Je remercie vivement Dr Nouar (CHU de Beni Messous) pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire d'anapathologie.

Je voudrais remercier plus particulièrement, une personne que je considère comme une deuxième mère, Dr Cherif Hamida Saida, de l'Université de Blida 1, pour son écoute, son aide, sa présence, ses précieux conseils, ses orientations et ses encouragements.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail.

Je dédie cette thèse,

A mes grands parents, que dieu les accueille dans son vaste paradis.

A mes très chers parents et mon frère Raouf. Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie. Avec toute ma tendresse.

A mon très cher époux Adel, que je remercie de tout mon cœur, pour m'avoir accompagné, encouragé, aidé et surtout soutenu moralement pendant ces années ; qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines. Vous avez de près ou de loin contribué à ce travail. Affectueuse reconnaissance.

Enfin, je tiens à remercier de tout mon cœur ma meilleure amie Sara Aouetta, pour son soutien sans faille et permanent.

Résumé

La présente étude contribue à la valorisation d'une plante médicinale appartenant à la famille des Lythraceae, *Punica granatum* L. Le grenadier possède une vaste histoire ethnomédicale et représente un réservoir phytochimique de valeur médicinale heuristique. Cependant, cette plante compte parmi les plantes médicinales le moins fréquemment utilisées dans notre pays en raison de l'ignorance de sa valeur thérapeutique. C'est dans ce but que nous nous sommes intéressés à la valorisation d'une variété locale et à l'évaluation de ses propriétés chimiques et biologiques à savoir : l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits d'écorces et du jus de grenade.

Le criblage phytochimique des extraits a permis de mettre en évidence la présence des principaux métabolites secondaires. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des tanins hydrolysables /condensés, des anthocyanes et des proanthocyanidines.

Une considérable activité antioxydante des extraits (méthanolique et aqueux) et du jus a été révélé par l'utilisant de trois méthodes; le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer ferrique et le blanchiment du β -carotène. Le jus de grenade a exprimé une valeur de la IC_{50} de l'ordre de 0.0012mg/ml, qui est inférieur à celle de l'acide ascorbique (0.013mg/ml). Le même extrait a exprimé un fort pouvoir réducteur avec une valeur de la IC_{50} de l'ordre de 0.095 mg/ml, qui est comparable à celle de l'acide ascorbique (0.075mg/ml). Les résultats obtenus démontrent que ces extraits possèdent une forte activité antioxydante et une forte capacité d'inhiber la peroxydation lipidique.

L'application des extraits comme, anti-inflammatoire aux doses 250 et 500mg/kg, a montré une inhibition hautement significative de l'œdème des pattes des souris, d'une manière dose dépendante après 6h de l'injection de la carraghénine. Ces résultats ont été confirmés par l'étude histologique, montrant ainsi la présence d'un infiltrat inflammatoire moins intense par rapport au groupe témoin où l'inflammation était plus prononcée prouvant ainsi que la carraghénine a bel et bien induit une réaction inflammatoire. L'activité antioxydante a été confirmée in vivo, en étudiant l'effet des extraits contre la toxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) chez les rats. Les extraits de grenade se sont avérés être hépatoprotecteurs contre les lésions hépatiques induites par le CCl_4 . En conclusion, la présente étude révèle une preuve biologique qui soutient l'utilisation du fruit du grenadier comme antioxydant, anti-inflammatoire et hépatoprotecteur.

Mots clés : *Punica granatum* L., extraits, polyphénols, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante, in vivo.

Abstract

This study contributes to the valorisation of a medicinal plant belonging to the Lythraceae family, *Punica granatum* L. Pomegranate tree possesses a vast ethnomedical history and represents a phytochemical reservoir of heuristic medicinal value. However, this plant is among the least frequently used medicinal plants in our country due to ignorance of its therapeutic value. It is for this purpose that we are interested in the valorization of a local variety and in the evaluation of its chemical and biological properties namely: Anti-inflammatory and antioxidant activity of peel extracts and pomegranate juice.

The phytochemical screening of the extracts allowed showing the presence of the principal secondary metabolites. This was confirmed by a quantitative analysis based on the determination of total polyphenols, flavonoids, hydrolyzable / condensed tanins, anthocyanins and proanthocyanidins.

Considerable antioxidant activity of the extracts (methanolic and aqueous) and juice was revealed by using three methods; DPPH free radical scavenging, ferric reducing power and β -carotene bleaching. Pomegranate juice expressed an IC₅₀ of about 0.0012 mg/ml, which is lower than that of the ascorbic acid (0.013 mg /ml). The same extract expressed strong reducing power with an IC₅₀ of about 0.095 mg / ml, which is comparable to that of the ascorbic acid (0.075 mg / ml). The results obtained demonstrate that these extracts have a high antioxidant activity and a strong ability to inhibit lipid peroxidation.

Applying the extracts as anti-inflammatory at doses 250 and 500mg/kg, showed a highly significant inhibition of mouse paw edema, in a dose-dependent manner after 6h of carrageenan injection. These results were confirmed by the histological study, thus showing the presence of a less intense inflammatory infiltrate compared to the control group where the inflammation was more pronounced thus proving that carrageenan did induce an inflammatory reaction. Antioxidant activity was confirmed in vivo by studying the effect of extracts against carbon tetrachloride (CCl₄) induced toxicity in rats. Pomegranate extracts have been shown to be hepatoprotective against CCl₄-induced liver injury. In conclusion, the present study reveals biological evidence that supports the use of pomegranate fruit as an antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotector.

Key words: *Punica granatum* L., extracts, polyphenols, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, in vivo.

ملخص

هذه الدراسة تساهم في تثمين نبات طبي ينتمي إلى عائلة Lythraceae، *Punica granatum L.*، لشجرة الرمان تاريخ عرقي طبي شاسع حيث أنها تحتوي على خزان كيميائي نباتي ذو قيمة طبية كبيرة، إلا أن هذه النبتة تعتبر من بين النباتات الطبية الأقل استعمالاً في بلادنا بسبب جهل قيمتها العلاجية. لهذا الغرض نحن مهتمون بتثمين النوع المحلي وتقييم خصائصه الكيميائية والبيولوجية التي تتمثل في النشاط المضاد للإلتهابات والمضاد للأوكسد لمستخلصات لحاء وعصير الرمان.

الفرز الكيميائي للمستخلصات مكننا من تسليط الضوء على وجود نواتج الأيض الثانوية الرئيسية وهذا ما تم تأكيده من خلال التحليل الكمي القائم على تركيز إجمالي لمتعددات البوليفينول، الفلافونويدات، التانينات المحللة والمركزة، الأنتوسيانينات واليراوتوسيانيدات.

تم اكتشاف نشاط معتبر مضاد للأوكسدة للمستخلصات (الكحول المثالي والمائي) وعصير الرمان باستخدام ثلاث طرق: محاصرة الجذر الحر DPPH، الحد من الحديد وتبييض البيتاكاروتين. حيث أن قيمة الـ IC_{50} (التركيز المثبط 50) لعصير الرمان قدرت بـ: 0,0012 مغ/مل وهي قيمة أقل من قيمة حمض الأسكوربيك (0,013 مغ/مل). أظهر نفس المستخلص قوة تخفيض عالية بقيمة IC_{50} قدرت بـ: 0,095 مغ/مل وهي تقارب قيمة حمض الأسكوربيك (0,075 مغ/مل).

النتائج المحصل عليها تثبت أن لهذه المستخلصات نشاط مضاد للأوكسدة ذو نسبة عالية وقدرة كبيرة على تثبيط دهون البيروكسيد.

استعمال المستخلصات كمضادات للإلتهاب بجرعات 250 و 500 مغ/كغ أظهر تثبيط معتبر لنزومة كغوف الفئران بشكل جرعة-معتمة بعد 6 ساعات من حقن الكراجينين. تم التأكد من هذه النتائج من خلال دراسة الأنسجة مما يدل على وجود تسلل للإلتهابات بحدّة أقل مقارنة بمجموعة الفئران الشاهدة أين كان الإلتهاب أكثر وضوحاً وهذا ما يثبت أن الكراجينين قد أدى بالفعل إلى تفاعل إلهابي. تم التأكد من فعالية النشاط المضاد للأوكسدة *in vivo* من خلال دراسة تأثير المستخلصات ضد سمية رباعي كلوريد الكربون (CCl_4) عند الفئران وقد تبين أن مستخلصات الرمان لها خاصية حماية الكبد ضد CCl_4 المسبب لتلف خلايا الكبد.

نستنتج في الأخير أن هذه الدراسة أثبتت وجود دعم بيولوجي هام لثمره الرمان باعتبارها مضادة للأوكسدة، للإلتهاب وحامية للكبد.

الكلمات المفتاحية:

Punica granatum L.، مستخلصات، البوليفينول، نشاط مضاد للإلتهاب، نشاط مضاد للأوكسدة، *in vivo*.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les principales espèces réactives de l'oxygène générées dans les systèmes biologiques.....	17
Tableau 02 : Propriétés pharmacologiques des différentes parties du grenadier.	42
Tableau 03 : Caractéristiques pomologiques du grenadier cultivar Doux de Messaad.	60
Tableau 04 : Caractéristique chimique du jus de <i>P. granatum</i> var. Doux de Messaad	61
Tableau 05 : Résultat du screening phytochimique du jus et des extraits de <i>P. granatum</i>	63
Tableau 06 : Teneurs en polyphénols totaux des trois extraits	65
Tableau 07 : Teneurs en flavonoïdes totaux des trois extraits	66
Tableau 08 : Teneurs en tanins hydrolysables et en tanins condensés des trois extraits	66
Tableau 09 : Teneurs en proanthocyanidines des trois extraits	67
Tableau 10 : Teneurs en anthocyanines des trois extraits.....	67
Tableau 11 : Concentration inhibitrice IC ₅₀ (mg/ml) du radical DPPH.....	69
Tableau 12 : Pouvoir réducteur des extraits de <i>P. granatum</i> exprimé en CE ₅₀	72
Tableau 13 : Taux de mortalité des souris après gavage des extraits de <i>P. granatum</i>	102
Tableau 14 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits méthanoliques, aqueux et du jus de <i>P. granatum</i>	Annexe I
Tableau 15 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les différents antioxydants de synthèse	Annexe I
Tableau 16 : Pouvoir réducteur des extraits de Punica granatum et de l'antioxydant de référence (Vitamine C)	Annexe I
Tableau 17 : Pouvoir réducteur des extraits de Punica granatum et de l'antioxydant de référence (Vitamine C)	Annexe I
Tableau 18 : Diamètres (en mm) des pattes des souris de chaque lot durant les six heures de l'expérimentation.	Annexe II

- Tableau 19** : Pourcentage d'augmentation (%AUG) de l'œdème des pattes des souris durant les six heures de l'expérimentation **Annexe II**
- Tableau 20** : Pourcentages d'inhibition (%INH) de l'œdème des pattes des souris durant les six heures de l'expérimentation. **Annexe II**
- Tableau 21** : Poids corporel des rats témoins et expérimentaux durant la période expérimentale **Annexe III**
- Tableau 22** : Paramètres biochimiques des rats témoins et expérimentaux..... **Annexe III**

Liste des figures

Figure 01	Migration des leucocytes des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire	4
Figure 02	Résumé des sources exogènes et endogènes de radicaux libres.	12
Figure 03	Stress oxydatif et ses conséquences	21
Figure 04	l'efficacité des divers antioxydants dans le corps humain en neutralisant les radicaux libres	22
Figure 05	Catabolisme de l'hème : mode d'action de l'hème oxygénase et de la biliverdine réductase.	27
Figure 06	Les différentes parties du grenadier	37
Figure 07	Station de récolte du grenadier étudiée	44
Figure 08	Schéma d'extraction par les solvants organiques de la poudre d'écorces de <i>Punica granatum</i> L.	48
Figure 09	Rendement en arilles, écorces et en jus	60
Figure 10	Rendements des extractions (en %) en utilisant différents solvants.	61
Figure 11	Pouvoir antioxydant des extraits organiques et du jus de fruit de <i>Punica granatum</i> par la méthode du piégeage du radical libre : DPPH	73
Figure 12	Concentration inhibitrice IC ₅₀ du radical DPPH des différents extraits du grenadier et des antioxydants de références.	75
Figure 13	Pouvoir réducteur des extraits (EM, EA, JPG) de <i>Punica granatum</i> testé par la méthode FRAP	76
Figure 14	Pouvoir réducteur des différents extraits (EM, EA, JPG) de <i>Punica granatum</i> testés par la méthode FRAP à une concentration de 0.5 mg/ml.	77
Figure 15	Pouvoir antioxydant des extraits organiques et du jus de fruit de <i>Punica granatum</i> testé par la méthode de la décoloration du β -carotène.	78
Figure 16	Administration des doses aux souris par gavage.	100
Figure 17	Injection sub-plantaire de la carragénine	102
Figure 18	Mesure du diamètre de gonflement de la patte à l'aide d'un pied de coulisse digital.	103
Figure 19	Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (% AUG) des souris témoin et des souris traitées par le Diclofenac pendant	109

	6h.	
Figure 20	: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (% AUG) des souris traitées par l'extrait aqueux à 250 et 500 mg/kg p.c pendant 6h.	110
Figure 21	: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte de souris prétraitées par l'extrait aqueux de <i>Punica granatum</i> à la dose 250 et 500mg/kg par rapport aux lots témoin et référence.	112
Figure 22	: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (% AUG) des souris traitées par l'extrait méthanolique à 250 et 500mg/kg p.c pendant 6h	113
Figure 23	: Pourcentage d'augmentation des groupes : témoin, standard, extrait méthanolique (EM) à 250 et 500mg/kg	115
Figure 24	: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (% AUG) des souris traitées par le jus brut des fruits de <i>Punica granatum</i> à 250 et 500 mg/kg p.c pendant 6h	116
Figure 25	: Pourcentage d'augmentation des groupes : témoin, standard, extrait méthanolique (EM) à 250 et 500mg/kg.	118
Figure 26	: Pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème de la patte des souris traitées par le produit de référence	119
Figure 27	: Pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème de la patte des souris traitées par l'extrait aqueux (EA) à 250 et 500 mg/kg p.c	120
Figure 28	: Pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème de la patte des souris traitées par l'extrait méthanolique à des doses de 250 et 500 mg/kg p.c	121
Figure 29	: Pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème de la patte des souris traitées par le jus brut du fruit de <i>Punica granatum</i> (JPG) à 250 et 500 mg/kg p.c	122
Figure 30	: Tissus enflammés des pattes des souris témoins (GX10 et GX40)	123
Figure 31	: Tissus enflammés de la patte des souris traitées par le produit de référence Diclofénac (GX10 et GX40)	124
Figure 32	: Tissus enflammés des pattes des souris traitées par l'extrait aqueux d'écorces de <i>Punica granatum</i> à la dose de 250 mg/kg (GX10 et X40)	125
Figure 33	: Tissus enflammés des pattes des souris traitées par l'extrait aqueux d'écorces de <i>Punica granatum</i> à la dose de 500 mg/kg (GX40)	126

Figure 34	: Tissus enflammés des pattes des souris traitées par l'extrait méthanolique d'écorces de <i>Punica granatum</i> à la dose de 250 mg/kg (GX10 et X40)	127
Figure 35	: Tissus enflammés des pattes des souris traitées par l'extrait méthanolique d'écorces de <i>Punica granatum</i> à la dose de 500 mg/kg (GX10 et X40)	128
Figure 36	: Tissus enflammés des pattes des souris traitées par le jus brut de fruit de <i>Punica granatum</i> à la dose de 250 mg/kg (GX10 et X40)	129
Figure 37	: Tissus enflammés des pattes des souris traitées par le jus de fruit de <i>Punica granatum</i> à la dose de 500 mg/kg (GX10 et X40)	130
Figure 38	: Administration par voie orale des extraits aux rats à l'aide d'une sonde gastrique.	140
Figure 39	: Prélèvement sanguin à partir du sinus caverneux par le biais des tubes micro-hématocrites	140
Figure 40	: Sacrifice et prélèvement des différents organes.	141
Figure 41	: Evolution du poids corporel des animaux au cours de l'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne±SEM de 5 animaux par groupe.	146
Figure 42	: Dosage de l'Alanine aminotransférase et de l'Aspartate aminotransférase sérique.	148
Figure 43	: Dosage de la bilirubine totale dans le sérum des rats normaux et expérimentaux	149
Figure 45	: Coupes histologiques au niveau du foie	152
Figure 46	: Coupes histologiques des reins	154
Figure 47	: Coupes histologiques des cerveaux	155
Figure 48	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	Annexe I
Figure 49	: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	Annexe I
Figure 50	: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables	Annexe I
Figure 51	: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés	Annexe I
Figure 52	: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des proanthocyanidines	Annexe I

Liste des abréviations

<i>ALT</i>	: Alanine aminotransferase
<i>AST</i>	: Aspartate aminotransferase
<i>APG</i>	: Angiosperm Phylogeny group
<i>BHA</i>	: Hydroxyanisole butylé
<i>BHT</i>	: Hydroxytoluène butylé
<i>BT</i>	: Bilirubine totale
<i>CCl₄</i>	: Tétrachlorure de carbone
<i>CE₅₀</i>	: Concentration efficace médiane
<i>CI</i>	: Concentration inhibitrice
<i>CRD</i>	: Centre de Recherche et de Développement.
<i>DL50</i>	: Dose létale moyenne entraînant la mort de 50% de la population.
<i>DPPH</i>	: 2,2-diphényl-1- picrylhydrazil.
<i>EA</i>	: Extrait aqueux
<i>EM</i>	: Extrait méthanolique.
<i>ERO</i>	: Espèces réactives de l'oxygène
<i>ERN</i>	: Espèces réactives de l'azote
<i>Fe Cl₃</i>	: Chlorure ferrique.
<i>g</i>	: Gramme.
<i>h</i>	: Heure
<i>HCl</i>	: Acide chlorhydrique.
<i>H₂O₂</i>	: Peroxyde d'hydrogène
<i>H₂ SO₄</i>	: Acide sulfurique
<i>IC50</i>	: Concentration inhibitrice à 50%
<i>INA</i>	: Institut National d'Agronomie.
<i>GGT</i>	: gamma-glutamyl transférase
<i>Kg</i>	: Kilogramme.
<i>KOH</i>	: Hydroxyde de potassium.
<i>KIO₃</i>	: Iodate de potassium
<i>K₃Fe(CN)₆</i>	: Ferricyanure de potassium
<i>M</i>	: Molarité
<i>Mg</i>	: Magnésium.

<i>mg</i>	: <i>Milligramme.</i>
<i>ml</i>	: <i>Millilitre.</i>
<i>mm</i>	: <i>Millimètre.</i>
<i>N</i>	: <i>Normalité</i>
<i>NaOH</i>	: <i>Hydroxyde de sodium</i>
<i>nm</i>	: <i>Nanomètre.</i>
OCDE	: <i>Organisation de coopération et de développement économiques</i>
<i>O.N.A.B</i>	: <i>Office Nationale des Aliments et du bétail.</i>
<i>PAL</i>	: <i>Phosphatase alcaline</i>
<i>p.c</i>	: <i>Poids corporel</i>
<i>SEM</i>	: <i>Standard error of mean (erreur type de la moyenne)</i>
<i>t</i>	: <i>Temps.</i>
<i>TBA</i>	: <i>Acide thiobarbiturique</i>
<i>TCA</i>	: <i>Acide trichloracétique</i>
<i>UV-Vis</i>	: <i>Ultraviolet-visible.</i>
<i>µg</i>	: <i>Microgramme.</i>
<i>µl</i>	: <i>Microlitre.</i>
<i>Var.</i>	: <i>Variété</i>
<i>v/v</i>	: <i>Rapport volume/ volume</i>
<i>%</i>	: <i>Pourcentage</i>
<i>°C</i>	: <i>Degré Celsius</i>

TABLES DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale

1^{ère} Partie. Synthèse bibliographique

Chapitre I. Inflammation et anti-inflammatoires	1
I.1. Inflammation.....	1
I.1.1. Inflammation aigue	2
I.1.1.1. Phase vasculaire	2
I.1.1.2. Phase cellulaire	5
I.1.1.3. Phase de résolution	5
I.1.2. Cellules et médiateurs de l'inflammation	5
I.1.2.1. Cellules de l'inflammation.....	5
I.1.2.2. Médiateurs de l'inflammation.....	8
I.1.3. Thérapeutique inflammatoire.....	11
I.1.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	11
I.1.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	12
I.1.3.3. Anti-inflammatoires naturels	13
Chapitre II. Stress oxydant et antioxydants	16
I.2. Stress oxydant	16
I.2.1. Radicaux libres.....	16
I.2.2. Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)	16
I.2.3. Production des radicaux libres	17
I.2.3.1. Production intracellulaire (endogène)	17

I.2.3.2. Production extracellulaire (exogène)	17
I.2.4. Production des radicaux libres oxygénés et azotés	18
I.2.5. Stress oxydant et ses conséquences biologiques	19
I.2.6. Antioxydants	21
I.2.6.1. Défenses enzymatiques	22
I.2.6.1.1. Superoxydes dismutases	22
I.2.6.1.2. Catalases	23
I.2.6.1.3. Peroxydases.....	23
I.2.6.1.4 Thiorédoxine/ thiorédoxine réductase.....	25
I.2.6.1.5. Hème oxygénase	26
I.2.6.1.6 Peroxyrédoxine	28
I.2.6.2. Défenses non enzymatiques	29
I.2.6.2.1. Vitamine E	29
I.2.6.2.2. Vitamine C	29
I.2.6.2.3. Vitamine A.....	30
I.2.7. Antioxydants phénoliques.....	30
I.2.7.1. Flavonoïdes	30
I.2.7.2. Caroténoïdes	31
I.2.8. Antioxydants synthétiques	31
I.2.9. Antioxydants naturels	31
I.2.10. Mécanisme d'action des antioxydants	32
Chapitre III. <i>Punica granatum</i> L.	33
I.3. Généralités sur l'espèce <i>Punica granatum</i> L. et de son fruit, la grenade	33
I.3.1. Historique du grenadier.....	33
I.3.2. Présentation du grenadier.....	34
I.3.2.1. Etymologie	34
I.3.2.2. Description botanique	34

I.3.2.3. Systématique	37
I.3.3. Origine et aires de répartition du grenadier	38
I.3.4. Phytochimie de <i>P. granatum</i>	39
I.3.5. Propriétés pharmacologiques	40

2^{ème} Partie. Matériel et méthodes, Résultats et Discussion

Chapitre I. Etude phytochimique du fruit de <i>Punica granatum</i> L	44
II.1. Matériel végétal	44
II.1.1. Choix de la plante et situation géographique.....	44
II.1.2. Collecte du matériel végétal	44
II.1.3. Critères pomologiques des grenades	45
II.1.3.1. Extraction du jus de fruit de <i>Punica granatum</i>	45
II.1.3.2. Caractérisation chimique du jus frais de grenades	45
II.1.4. Préparation des extraits bruts.....	47
II.1.4.1. Extraction à chaud par les solvants organiques à polarité croissante	47
II.1.4.2. Préparation de l'extrait aqueux.....	48
II.1.4.2.1. Lyophilisation de l'extrait aqueux	49
II.1.5. Analyse qualitative	49
II.1.5.1. Préparation des solutions mères	49
II.1.5.2. Caractérisation des principaux constituants chimiques	49
II.1.6. Analyse quantitative	53
II.1.6.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux	53
II.1.6.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes	53
II.1.6.3. Détermination de la teneur des tanins hydrolysables	54
II.1.6.4. Détermination de la teneur en tanins condensés.....	54
II.1.6.5. Détermination de la teneur en anthocyanes totaux.....	55
II.1.6.6. Détermination du contenu en proanthocyanidines	55
II.1.7. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante des extraits de <i>Punica granatum</i>	56

II.1.7.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH	56
II.1.7.2. Méthode de réduction du Fer : FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>)	57
II.1.7.3. Méthode de décoloration du β -carotène	58
II.1.8. Etude statistique.....	59
II.1.9. Résultats de l'étude phytochimique	60
II.1.9.1. Caractéristiques pomologiques.....	60
II.1.9.2. Taux de solides solubles, de l'acidité titrable, pH et l'indice de maturité	61
II.1.9.3. Rendement des extractions	61
II.1.9.4. Analyse qualitative (screening phytochimique)	62
II.1.9.5. Analyse quantitative	65
II.1.9.5.1. Teneur en polyphénols totaux.....	65
II.1.9.5.2. Teneur en flavonoïdes	65
II.1.9.5.3. Teneur en tannins hydrolysables et condensés	66
II.1.9.5.4. Teneur en proanthocyanidines.....	67
II.1.9.5.5. Teneur en anthocyanines	67
II.1.9.6. Activité antioxydante des extraits d'écorces et du jus de fruit de <i>P. granatum</i>	68
II.1.9.6.1. Piégeage du radical libre DPPH	68
II.1.9.6.2. Réduction du fer (FRAP).....	71
II.1.9.6.3. Décoloration du β -carotène	73
II.1.10. Discussion.....	74
Chapitre II. Etude de l'activité anti-inflammatoire in vivo	94
II.2. Matériel animal.....	94
II.2.1. Etude de la toxicité aigüe.....	94
II.2.1.1. Test de la dose limite	94
II.2.1.2. Test de toxicité aigüe des extraits à différentes concentrations/doses.....	95
II.2.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	95
II.2.3. Etude histologique	99

II.2.4. Etude statistique.....	101
II.2.5. Résultats.....	102
II.2.5.1. Toxicité aigue	102
II.2.5.1.1. Essai limite	102
II.2.5.1.2. Toxicité aigüe des extraits à différentes concentrations/doses.....	102
II.2.5.2. Activité anti-inflammatoire in vivo	103
II.2.5.2.1. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG)	103
II.2.5.2.1.1. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte des souris témoins	103
II.2.5.2.1.2. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte du lot standard	103
II.2.5.2.1.3. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte des souris traitées par l'extrait aqueux à 250 et 500mg/kg	104
II.2.5.2.1.4 Comparaison entre les pourcentages d'augmentation des lots (Témoin, standard, extrait aqueux à 250 et 500mg/kg)	106
II.2.5.2.1.5 Pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG) des lots traités par l'extrait méthanolique à 250mg/kg et à 500mg/kg	107
II.2.5.2.1.6. Comparaison entre les lots (Témoin, standards, extrait méthanolique à 250 et 500mg/kg)	109
II.2.5.2.1.7. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG) des lots traités par le jus brut de fruit de <i>Punica granatum</i> à 250 et 500 mg/kg p.c	110
II.2.5.2.1.8. Comparaison entre les lots (Témoin, standard, jus à 250mg/kg et jus à 500mg/kg)	112
II.2.5.2.2. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH)	113
II.2.5.2.2.1. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte du lot standard	113
II.2.5.2.2.2. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte des lots traités par l'extrait aqueux à 250 et 500 mg/kg	114
II.2.5.2.2.3. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte des lots traités par l'extrait méthanolique à 250 et 500 mg/kg p.c	115
II.2.5.2.2.4. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte des lots traités par le jus brut de fruit de <i>Punica granatum</i> à 250 et 500 mg/kg	116
II.2.5.3. Etude histologique de l'activité anti-inflammatoire in vivo.....	117
II.2.5.4. Discussion.....	126

Chapitre III. Etude de l'activité antioxydante in vivo	133
II.3. Matériel animal.....	133
II.3.1. Répartition des rats	133
II.3.2. Induction de l'intoxication.....	133
II.3.3. Prétraitement par les extraits	133
II.3.4. Prélèvements sanguins.....	135
II.3.5. Analyse biochimiques.....	135
II.3.6. Procédure histologique	135
II.3.7. Détermination de l'acide thiobarbiturique (TBARS)	136
II.3.8 Etude histologique	137
II.3.9. Etude statistique.....	140
II.3.10. Résultats.....	141
II.3.10.1. Evolution du poids corporel des rats normaux et expérimentaux	141
II.3.10.2. Paramètres biochimiques des rats normaux et expérimentaux	143
II.3.10.3. Détermination de l'acide thiobarbiturique (TBARS) réactive des substances dans les échantillons de tissus	145
II.3.10.4. Résultats de l'étude histologique	146
II.3.10.5. Discussion.....	154
III. Conclusion générale.....	158

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale

Au cours des dernières années, de nombreuses études suggèrent que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont un médiateur de l'inflammation. La surproduction des espèces réactives de l'oxygène, son association avec le stress oxydatif et les réponses inflammatoires jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de diverses maladies chroniques telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'obésité, le cancer, les maladies infectieuses et les maladies neurodégénératives.

La surproduction de ces espèces et son stress oxydatif conséquent peuvent causer des dommages oxydatifs des macromolécules cellulaires comprenant des lipides, des protéines, et l'ADN aussi bien que la modulation des systèmes anti-inflammatoires et antioxydants. De plus, il a été démontré que le stress oxydatif induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans les réponses inflammatoires et les mécanismes de défense cellulaire.

Guérir avec les plantes médicinales est aussi vieux que l'humanité elle-même. La relation entre l'homme et les plantes, date depuis l'Antiquité. Les plantes ont fourni à l'homme tous ses besoins en termes d'abris, de vêtements, de nourriture, de saveurs et de parfums, mais surtout elles étaient une source de médicaments et de remèdes à fin de soigner les différentes maladies.

Les plantes ont formé la base des systèmes de médecine traditionnelle qui existent depuis des milliers d'années et continuent de fournir de nouveaux remèdes à l'humanité. Ces systèmes de médecine ont donné lieu à certains médicaments importants encore en usage aujourd'hui. La recherche de nouvelles molécules, de nos jours, a pris un chemin légèrement différent où la science de l'ethnobotanique et de l'ethnopharmacognosie sont utilisées comme guide pour la découverte des différentes sources et classes de composés.

Au cours des deux dernières décennies, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation de composés polyphénoliques naturels à base de plantes pour le traitement de plusieurs maladies en raison de leurs effets thérapeutiques puissants. Des études à la fois *in vitro* et *in vivo*, montrent que certains composés naturels et/ou leurs dérivés peuvent protéger les cellules contre le stress oxydatif comme antioxydants, améliorant ainsi diverses maladies liés au stress oxydatif.

De nouvelles approches systématiques et scientifiques sont nécessaires pour le développement de médicaments actifs dérivés de plantes. De plus, l'extraction de grandes quantités de composés à partir de sources naturelles reste un défi et nécessite le développement de nouvelles approches biotechnologiques et de la synthèse organique totale. Malgré ces lacunes, les recherches actuelles suggèrent que les produits naturels représenteront probablement une source majeure de nouveaux médicaments dans le futur.

Dans le contexte de recherche des remèdes naturels dotés de certains pouvoirs préventifs et/ou curatifs présentant le moins d'effets indésirables possibles et dans le but de la valorisation de flore Algérienne, nous nous sommes intéressées à l'étude d'une plante médicinale connue pour son fruit mais méconnue pour ses vertus thérapeutiques.

Notre choix s'est porté sur le grenadier (*Punica granatum* L.). Toutefois, il existe plusieurs variétés en Algérie, nous avons opté pour une variété locale très répandue dans la région de la Mitidja ; la variété « Doux de Messaad ».

La grenade (*Punica granatum* L.) est un fruit ancien avec des applications ethnomédicales exceptionnellement riches. L'écorce (péricarpe) est bien considérée pour ses propriétés astringentes ; les graines pour conférer l'invulnérabilité au combat et stimuler la beauté et la fertilité. Les grenades ont été largement utilisées dans la médecine populaire de nombreuses cultures. C'est un fruit ancien avec une histoire médicale illustre et a fait l'objet de critiques classiques depuis plus de 100 ans. Plusieurs chercheurs ont rapporté que les utilisations modernes des produits dérivés de la grenade comprennent maintenant la prévention et le traitement de certains types de cancer tels que le cancer du poumon et le cancer de la prostate.

C'est dans l'optique de trouver une base scientifique à son utilisation en médecine traditionnelle et dans le but de valoriser la flore locale que s'inscrit notre travail. Pour cela notre étude est présentée comme suit :

Dans un premier temps, une partie bibliographique apportera les grands concepts relatifs aux stress oxydant, les antioxydants, l'inflammation et les anti-inflammatoire, en plus des rappels sur le grenadier (*Punica granatum*) et de son fruit.

Dans un second temps, une partie pratique qui exposera les méthodes utilisées, les différents résultats obtenus et leur discussion. Le premier axe étudié, concerne le criblage phytochimique de *Punica granatum* L. Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés d'une part, à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire en utilisant la méthode par la

carraghénine et d'autre part de l'activité antioxydante in vitro et in vivo des extraits d'écorces et de jus de fruit de la plante étudiée.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre I.

Inflammation et anti-inflammatoires

I.1. Inflammation

L'inflammation est un phénomène omniprésent qui opère lors de perturbations sévères de l'homéostasie tissulaire, comme l'infection, les blessures et l'exposition aux contaminants et est déclenchée par les systèmes immunitaires innés et adaptatifs pour combattre les intrus pathogènes (**Medzhitov, 2008 ; Ashley et al., 2012**). L'inflammation, lorsqu'elle est correctement réglée, est susceptible d'adaptation. Mais, parfois, la réaction inflammatoire dépasse ses objectifs. Lorsqu'elle persiste pendant une longue durée, elle peut être à l'origine d'effets délétères, mais il s'agit là du prix que l'organisme doit parfois payer pour assurer le maintien de son intégrité.

Une réponse inflammatoire contrôlée est généralement prise comme étant bénéfique, par exemple, en fournissant une protection contre l'infection, mais elle peut devenir préjudiciable si elle est dérégulée et/ou insuffisante, engendrant des dommages irréversibles ; en augmentant ainsi la morbidité et la mortalité dans des pathologies comme la goutte, l'arthrite rhumatoïde, la maladie du Crohn ou encore le diabète de type 2 (**Medzhitov, 2008 ; Ashley et al., 2012 ; Furie, 2014**). Une inflammation mal contrôlée peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation sanguine et peut alors conduire à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, par exemple, provoquant un choc septique et dans les cas les plus graves le décès (**Nathan, 2002; Barton, 2008**).

Ces états inflammatoires chroniques ne semblent pas être causés par les instigateurs classiques de l'inflammation: infection et blessure. Au contraire, ils semblent être associés au dysfonctionnement du tissu, c'est-à-dire au déséquilibre homéostatique de l'un de plusieurs systèmes physiologiques qui ne sont pas directement liés à la défense de l'hôte ou à la réparation tissulaire (**Medzhitov, 2008**).

La réponse inflammatoire est associée au système immunitaire, dont la fonction est de protéger contre les infections, comprend deux branches interconnectées: une plus primitive appelée immunité innée et la plus récente, appelée immunité adaptative (spécifique) (**Gattorno et Martini, 2016**). L'immunité innée et adaptative ne sont pas deux compartiments séparés mais un système intégré de défense de l'hôte, partageant des interactions bidirectionnelles fondamentales à la fois pour la phase d'induction et la phase effectrice de la réponse immunitaire (**Gattorno et Martini, 2016**). Les cellules du système immunitaire inné

possèdent des récepteurs PRR et des voies de signalisation hautement conservés pour détecter et réagir face à une infection ou à une blessure. La détection de ces signaux exogènes d'origine microbienne, les PAMPs, ou endogènes, les alarmines (**Bianchi, 2007 ; Medzhitov, 2007 ; Broz et Monack, 2013 ; Gattorno et Martini, 2016**), va conduire à l'initiation de la cascade inflammatoire et à l'activation d'une réponse immunitaire acquise ou adaptative (**Barton, 2008; Medzhitov, 2008**). D'autre part, le système immunitaire adaptatif est responsable de l'élimination des agents pathogènes dans la phase tardive de l'infection, du maintien de la tolérance immunologique et de la génération de la mémoire immunologique (**Gattorno et Martini, 2016**).

Cette réponse inflammatoire se déroule en quatre étapes : la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (**Barton, 2008 ; Medzhitov, 2008 ; Soehnlein et Lindbon, 2010**). En absence d'une résolution, s'installe une inflammation chronique (**Drayton et al., 2006 ; Furie, 2014 ; Gattorno et Martini, 2016**).

I.1.1. Inflammation aigue

C'est une réponse immédiate à un agent agresseur qui se définit comme une série de réactions tissulaires qui peuvent survenir dans les premières heures suivant la blessure. Elle a une durée relativement courte de quelques jours ou semaines, d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. L'inflammation *aiguë guérit spontanément ou avec un traitement, mais peut laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante* (**Charles et al., 2010**). L'inflammation aigue peut être divisée en trois grandes phases :

I.1.1.1. Phase vasculaire (Réaction vasculo-exsudative)

Ce sont des mécanismes immédiats de l'ordre de la minute qui se mettent en route en réponse à une agression dont le but est d'alerter et de recruter des cellules de l'immunité naturelle. Cette phase est caractérisée par des modifications de la microcirculation locale et elle se traduit cliniquement par 4 phénomènes typiques, signes cardinaux de Celsius, qui sont le gonflement (Edème), la douleur, la chaleur et l'érythème (**Weill et Batteux, 2003**).

La phase vasculo-exsudative ou vasculaire comporte trois modifications élémentaires qui sont la congestion active, l'œdème inflammatoire et les diapédèses leucocytaires.

- **Congestion active**

Le déclenchement de cette phase est dû à une vasodilatation survenue après une phase de vasoconstriction, extrêmement brève, de quelques secondes, de type réflexe sous l'action du système nerveux sympathique. Elle est artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte, entraînant un érythème, un dégagement de chaleur locale. Cette phase est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine. Ces médiateurs activent les plaquettes présentes dans la circulation, ce qui conduira à une vasodilatation des vaisseaux sanguins (**Weill et Batteux, 2003**).

L'augmentation du débit micro-circulatoire explique partiellement l'apparition de chaleur et de rougeur. L'exsudation plasmatique va induire un œdème par distension des tissus et provoquer une hyper-pression sur les terminaisons nerveuses locales. Ainsi s'expliquent les sensations de tuméfaction et de douleur (**Weill et Batteux, 2003**).

- **Œdème inflammatoire**

L'œdème survient lorsqu'un volume excessif d'un liquide appelé exsudat, fait d'eau et de protéines plasmiques, s'accumule dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses. Il résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, dont l'histamine

- **Diapédèse leucocytaire**

La diapédèse ou la migration transendothéliale (TEM), est le processus par lequel les leucocytes se compriment de façon amibe à travers les cellules endothéliales (**Sumagin et Sarelius, 2010 ; Woodfin et al., 2011**). Cette migration transendothéliale s'effectue en quatre étapes successives : la capture, le roulement, l'adhésion cellulaire et la diapédèse (**Muller, 2013**) (**Figure 01**).

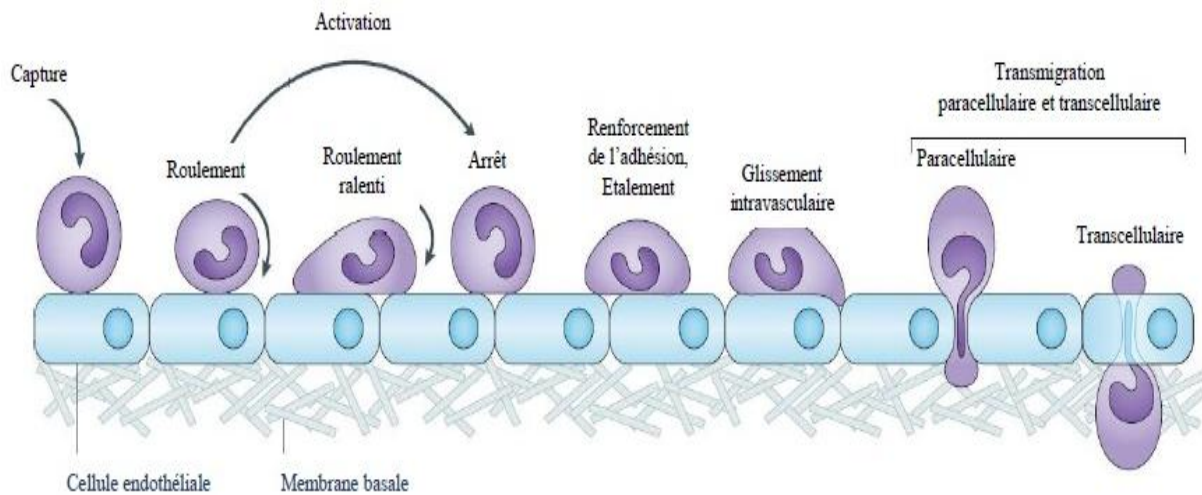


Figure 01: Migration des leucocytes des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire.

Dans les veinules post-capillaires au niveau des sites d'infection, les modifications locales de l'hémodynamique entraînent une réduction importante du débit sanguin. Cela augmente les chances que les leucocytes entrent en contact avec les cellules endothéliales qui tapissent le vaisseau. Les molécules d'adhésion leucocytaire, dont l'expression à la surface des cellules endothéliales est induite par la réponse inflammatoire, augmentent les chances que ces contacts conduisent à une liaison productive (Muller, 2013).

La TEM est médiée par une série d'interactions complexes et séquentielles entre les leucocytes et la surface apicale endothéliale via divers récepteurs d'adhérence. Dans un premier temps, l'endothélium qui a été activé par des cytokines pro-inflammatoires exprime des sélectines endothéliales (E) et plaquettaires (P) sur la surface apicale endothéliale, ils capturent les leucocytes et facilitent leur enroulement sur l'endothélium via la sélectine leucocytaire (L). Le but de l'enroulement et de l'enroulement lent est de mettre le leucocyte en contact avec les cellules endothéliales de sorte que le leucocyte puisse être davantage activé par des chimiokines et d'autres agents pro-inflammatoires présentés à la surface endothéliale, ce qui conduit à l'activation des intégrines leucocytaires (Kunkel et Ley, 1996 ; Ley et al., 2007). Par la suite, l'adhésion ferme est contrôlée par les récepteurs d'adhésion de la famille des immunoglobulines, à savoir les intégrines leucocytaires (LFA-1, Mac-1, et VLA-4), qui se lient à leurs ligands endothéliaux, y compris ICAM (ICAM-1 et -2) et la molécule 1 d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1), respectivement. Après ces étapes, la TEM peut se produire via la migration des leucocytes par des jonctions entre les cellules endothéliales

adjacentes (TEM paracellulaire) ou à travers le corps de l'endothélium (TEM transcellulaire) (Ley et al., 2007 ; Luo et al., 2007 ; Muller, 2013 ; Nourshargh et Alon, 2014).

I.1.1.2. Phase cellulaire

La phase cellulaire fait suite à la diapédèse. Les leucocytes poursuivent leur progression jusqu'au foyer inflammatoire ; les premiers sur place sont les polynucléaires neutrophiles (PN), qui vont être progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes/macrophages dont la fonction est d'assurer la détersion grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (Horvat, 2010)

I.1.1.3 Phase de résolution

La *phase de résolution*, ou de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la *phase* de cicatrisation et de régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps en la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles mêmes, ces cellules pouvant produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction du tissu atteint, d'autres cellules vont intervenir pour réparer le nouveau tissu. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre.

I.1.2. Cellules et médiateurs de l'Inflammation

I.1.2.1. Cellules de l'inflammation

Les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire sont :

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont le sous type de leucocytes circulants le plus abondant et souvent les premiers à s'accumuler en grand nombre sur les sites d'infection ou d'inflammation (**Fiset et al., 2003 ; Sherwood et Toliver-Kinsky, 2004**). En tant que composant clé de la réponse inflammatoire, les neutrophiles apportent des contributions importantes au recrutement, à l'activation et à la programmation des cellules présentatrices d'antigène. Les neutrophiles génèrent des signaux chimiotactiques qui attirent les monocytes et les cellules dendritiques (CD), et influencent la différenciation des macrophages en un état principalement pro ou anti-inflammatoire. Elles sont également impliquées dans la réparation tissulaire (**Nathan, 2006**).

Les mastocytes sont principalement localisés au niveau des tissus vascularisés tels que les muqueuses et les épithéliums, et particulièrement au niveau des surfaces exposées à l'environnement comme le tractus digestif, la peau et les voies aériennes. Cependant, ils se retrouvent également dans d'autres tissus comme le système nerveux où ils sont très nombreux, la membrane synoviale ou l'os. De plus, ils jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie par son phénomène de dégranulation (**Frenzel et Hermine, 2013 ; Da Silva et al., 2014**). Ils se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de très nombreuses granulations (50 à 200) contenant des médiateurs inflammatoires, y compris l'histamine, l'héparine, une variété de cytokines, le sulfate de chondroïtine et des protéases neutres (**Krystel-Whittemore et al., 2015**).

Les monocytes et les macrophages tissulaires constituent le système des phagocytes mononucléés qui complète les fonctions du système phagocytaires des neutrophiles (**Galask et Larsen, 2012**). De nombreuses situations engendrent l'activation des macrophages rencontre avec un micro-organisme, avec une particule inerte, avec un produit de dégradation tissulaire ou liaison avec un ligand naturel pour un de leurs récepteurs : anticorps, thrombine, fibrine, facteurs de croissance, cytokines (**Rankin, 2004**).

Les plaquettes sanguines sont un élément clé liant les processus de l'hémostase, de l'inflammation et de la réparation tissulaire (**Klinger et Jelkmann, 2002**). Elles sont reconnues comme des acteurs clés dans les réponses immunitaires innées et adaptatives (**Herter et al., 2014**). Les plaquettes contiennent un certain nombre de médiateurs inflammatoires des peptides et des protéines, tandis que d'autres sont stockés et sécrétés à partir de granules (granules denses, α -granules ou lysosomes). La libération de ces cytokines

et chimiokines, ainsi que les eicosanoïdes, lors de l'activation permet aux plaquettes de recruter des leucocytes au site d'inflammation ou de blessure (**Shi et Morrell, 2011 ; Arman et al., 2015**).

Les basophiles ou granulocytes basophiles sont les plus rares et représentent moins de 1 % des cellules inflammatoires. Lorsqu'ils sont activés, les basophiles se dégranulent pour libérer une variété de médiateurs immunitaires tels que l'histamine, les protéoglycanes (par exemple le chondroïtine et le sulfate de chondroïtine) et les enzymes protéolytiques, qui sont pré-stockés dans des granules cytoplasmiques (**Schroeder et al., 2009**). Ils sont capables de promouvoir l'inflammation allergique chronique, de réguler la fonction cellulaire T-helper 2 (Th2), la mémoire des cellules immunitaires et même de jouer un rôle de cellules présentatrices d'antigènes (**Kawakami 2008 ; Voehringer 2013 ; Zhong et al., 2014**).

Les polynucléaires éosinophiles sont des granulocytes circulants produits dans la moelle osseuse. Ce sont les principaux types de cellules qui peuvent être recrutés sur des sites de réponses immunologiques ou inflammatoires (**Huang et al., 2009 ; Isobe et al., 2012 ; Uhm et al., 2012**). La fonction effectrice des éosinophiles est liée à leur libération de protéines granulaires toxiques, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de cytokines et de médiateurs lipidiques (**Liu et al., 2006**). Bien que les éosinophiles aient été traditionnellement considérés comme des cellules effecteurs cytotoxiques, de nouvelles connaissances sur les voies moléculaires ont permis une meilleure compréhension des fonctions immunomodulatrices de ces cellules (**Rosenberg et al., 2013**). Plus récemment, il a été démontré que les éosinophiles participent à la défense de l'hôte contre les virus respiratoires (**Foster et al., 2008**). Avec la capacité des éosinophiles à stocker les cytokines préformées, les chimiokines et les facteurs de croissance disponibles pour une utilisation immédiate, ils jouent plusieurs rôles favorisant l'initiation et le maintien des réponses immunitaires dans l'inflammation, en plus de maintenir la fonction de la barrière épithéliale, affectant le remodelage tissulaire et de combler l'immunité innée et adaptative (**Spencer et al., 2009; Shamri et al., 2011**).

Les fibroblastes sont des cellules du tissu conjonctif extrêmement versatiles qui présentent une capacité remarquable à se différencier des autres membres de la famille des tissus conjonctifs, notamment le cartilage, les os, les adipocytes et les cellules musculaires lisses (**Buckley et al., 2004**); ils régulent l'inflammation, la cicatrisation des plaies et ils

secrètent des composants fibrillaires de la matrice extracellulaire (MEC) (comme les collagènes de types I, III, IV) (**Naguib and Cui, 2014**).

Les lymphocytes sont la troisième lignée de leucocytes et sont divisés en deux sous-groupes principaux, les lymphocytes T qui se différencient dans le thymus et les lymphocytes B acquièrent leur maturation dans la moelle osseuse. Les lymphocytes T médient la réponse immunitaire retardée (immunité à médiation cellulaire) en régulant les fonctions des lymphocytes B et des phagocytes macrophages. En revanche, les lymphocytes B ne jouent aucun rôle dans l'immunité à médiation cellulaire. Ils se transforment en cellules B productrices de plasma ou de mémoire, et grâce à la libération de diverses cytokines par exemple; IF- γ , IL-2 et TGF- β), elles améliorent la fonction des macrophages (**Chaplin, 2010**).

Les cellules endothéliales des vaisseaux jouent un rôle important dans l'initiation, l'amplification et la résolution de la réponse inflammatoire (**Xiao et al., 2013**). L'endothélium vasculaire qui tapisse les vaisseaux sanguins forme une barrière restrictive continue et semi-permeable permettant le passage de macromolécules, de cellules inflammatoires et de liquide entre le sang et l'espace interstitiel (**Mittal et al., 2014**). Les cellules endothéliales sont capables de participer aux phénomènes de réparation post inflammatoire par la production de protéines matricielles et de différentes protéases (**Aggarwal et Shishodia, 2006**).

I.1.2.2. Médiateurs de l'inflammation

Les inducteurs de l'inflammation déclenchent la production de nombreux médiateurs qui peuvent être dérivés des protéines plasmatiques ou sécrétés par des cellules (macrophages ; mastocytes résidents, basophiles, plaquettes). La concentration plasmatique de ces médiateurs peut augmenter considérablement au cours de la phase aiguë de l'inflammation, résultant de la sécrétion accrue des précurseurs par les hépatocytes. Ces médiateurs inflammatoires sont classés selon leurs propriétés biochimiques (**Medzhitov, 2008**).

- Les amines vasoactives : Histamine et sérotonine

Ils sont responsables des réponses immédiates et de courte durée de l'inflammation, y compris la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. L'histamine et la sérotonine sont les amines vasoactives les plus importants, libérés de la dégranulation des mastocytes et des plaquettes (**Medzhitov, 2008**).

- Les peptides vasoactifs

Les peptides vasoactifs peuvent être stockés sous une forme active dans des vésicules de sécrétion (par exemple, substance P) ou générés par traitement protéolytique de précurseurs inactifs dans le liquide extracellulaire (par exemple, kinines, fibrinopeptide A, fibrinopeptide B et produits de dégradation de fibrine).

Substance P est libérée par les neurones sensoriels et peut elle-même causer la dégranulation des mastocytes. D'autres peptides vasoactifs sont générés par protéolyse par le facteur Hageman, la thrombine ou la plasmine et provoquent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire (directement ou en induisant la libération d'histamine par les mastocytes). Comme mentionné précédemment, le facteur de Hageman a un rôle clé dans la coordination de ces réponses, et il fonctionne à la fois comme un capteur de dommages vasculaires et un inducteur de l'inflammation. Le facteur Hageman active la cascade de kallikréine-kinine, et le produit principal de cette cascade, la bradykinine, affecte le système vasculaire, en plus d'avoir un puissant effet pro-algique (stimulant la douleur). Cette sensation de douleur a un rôle physiologique important dans l'inflammation en alertant l'organisme de l'état anormal du tissu endommagé (**Medzhitov, 2008**).

- Les anaphylotoxines

Le système du complément constitué d'un ensemble de composants, de récepteurs et de régulateurs est un élément clé de l'immunité innée. Son activation se produit lors d'une infection ou d'une lésion tissulaire par l'une des trois voies principales (classique, lectine et alternative) (**Peng et al., 2009**).

Les fragments C3a, C4a et C5a sont des produits biologiquement actifs provenant du clivage des protéines C3, C4, C5 ; Il s'agit de la kallikréine, de la plasmine et d'enzyme lysosomales (**Millet, 2014**).

Les effets biologiques de C5a et d'autres anaphylatoxines (dans un ordre général d'activité C5a > C3a > C4a) comprennent la chimiotaxie leucocytaire, l'agrégation des PMN et des

plaquettes, augmentation de la perméabilité capillaire, libération de cytokines (telles que interleukine IL-6, IL-8 et IL-1), production de leucotriènes et d'intermédiaires réactifs de l'oxygène et l'augmentation de l'adhésion des cellules neutrophiles- endothéliales (**Holers, 2000**).

- Les médiateurs lipidiques

Les leucotriènes, les prostaglandines et les thromboxanes font partie du groupe des eicosanoïdes (**Serhan et al., 2014**). En réponse à l'IL-1 ou au TNF, de très nombreuses cellules néo-synthétisent la phospholipase A2, une enzyme qui transforme les acides gras membranaires en acide arachidonique ; la transformation de ce dernier en prostaglandines (par exemple PGE2) et en thromboxane (par exemple TXA2) est assurée suite à la néosynthèse de la cyclooxygénase inductible de type 2 (Cox2).

Les PGE2 sont responsables de la vasodilatation et de l'augmentation du flux sanguin. Face au rôle pro-inflammatoire des PGE2, ils présentent des propriétés anti-inflammatoires comme leur capacité de limiter la production de TNF.

Le TXA2 est vasoconstricteur, responsable de l'agrégation plaquettaire et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

La transformation de l'acide arachidonique par la lipoxygénase aboutit à la génération des leucotriènes (LTC4 vasoconstricteur, LTB4 chimiotactique, ou LTD4 amplificateur de la perméabilité vasculaire) et à une augmentation par les cellules endothéliales des prostacyclines (PGI2) (vasodilatatrices et désagrégantes plaquettaires). Par ailleurs, la durée de vie de ces médiateurs lipidiques est très courte (demi-vie inférieure à 30 secondes pour le thromboxane A2 à un pH physiologique) (**Cavaillon, 1995**).

- Les cytokines et chimiokines

Il existe à la fois des cytokines anti-inflammatoires et des cytokines pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), IL-1, IL-6 et beaucoup d'autres) qui sont produites par de nombreux types de cellules, principalement par les macrophages et les mastocytes. Ils ont plusieurs rôles dans la réponse inflammatoire, y compris l'activation de l'endothélium et des leucocytes ainsi que l'induction de la réponse en phase aiguë. Parmi les cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10 est une cytokine aux propriétés anti-inflammatoires puissantes, réprimant l'expression des cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 par les macrophages activés. En outre, l'IL-10 peut réguler à la hausse les anti-cytokines endogènes

et réguler à la baisse les récepteurs pro-inflammatoires des cytokines. Ainsi, il peut contre-réguler la production et la fonction des cytokines pro-inflammatoires à plusieurs niveaux (**Wieseler-Frank et al., 2004**).

Par ailleurs, les chimiokines sont produites par de nombreux types de cellules en réponse aux inducteurs de l'inflammation. Les chimiokines ont conservé des résidus de cystéine qui leur permettent d'être répartis en quatre groupes: les chimiokines CC, les chimiokines CXC, les chimiokines C (lymphotactine) et les chimiokines CXXXC (fractalkine). Ils contrôlent l'extravasation des leucocytes et chimiotaxie vers les tissus affectés (**Zhang et al., 2007**).

- Enzymes protéolytiques

Plusieurs enzymes protéolytiques (y compris l'élastine, les cathepsines et les métalloprotéinases matricielles MMP) ont des rôles divers dans l'inflammation, en partie à travers la dégradation de l'MEC et des protéines de la membrane basale. Ces protéases ont des rôles importants dans de nombreux processus, y compris la défense de l'hôte, le remodelage tissulaire et la migration des leucocytes (**Medzhitov, 2008**).

I.1.3. Thérapeutique inflammatoire

Un certain nombre de médicaments ont été développés pour soigner les maladies d'origine inflammatoire chronique. Ces médicaments peuvent être divisés en deux groupes: les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).

I.1.3.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Actuellement, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont parmi l'une des classes thérapeutiques les plus couramment utilisés dans le monde, que ce soit dans le cadre de la prescription médicale ou de celui de l'automédication (**Jouzeau et al., 2004**). Les AINS sont un large groupe d'inhibiteurs de la biosynthèse des prostaglandines par la cyclooxygénase (COX), soit en modifiant de manière covalente l'enzyme, soit en rivalisant avec le substrat actif (**Carbone et al., 2013 ; Ambriz-Pérez et al., 2016**). L'acide arachidonique, qui est produit à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase A qui sert de substrat pour la production des eicosanoïdes, leucotriènes, thromboxanes, prostacyclines et

prostaglandines. Dans la voie de synthèse des prostaglandines, la production de ces derniers par les cyclooxygénases joue un rôle essentiel.

Malgré leurs structures chimiques différentes, tous les inhibiteurs de la COX présentent des actions thérapeutiques similaires telles que l'activité anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique.

L'enzyme COX existe dans au moins deux formes: une isoforme principalement constitutive (COX-1), produisant du thromboxane qui favorise l'adhésion plaquettaire et la vasoconstriction et d'une importance particulière pour la protection gastro-intestinale (**Hodgson, 2015**). La COX-2 est une forme inductible dont l'expression est renforcée par des cytokines, des facteurs de croissance et d'autres stimuli ulcérogènes inflammatoires (**Seibert et al., 1997 ; Hawkey, 2001 ; Kyrikou et al., 2004**).

La plupart des AINS inhibent COX-1 et COX-2 avec peu de sélectivité. Cependant, l'inhibition de ces actions est responsable de la majorité des effets indésirables des AINS, tels que l'irritation de l'estomac, les ulcères gastro-intestinaux et toxicité rénale, qui sont principalement liés à l'activité inhibitrice de la COX-1 (**Sandilands et Bateman, 2016**).

I.1.3.2. Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde (GC) qui sont des hormones stéroïdes produites par la glande surrénale et régulées par l'axe hypothalamo-hypophyséo-surrénalien (**Faure, 2009 ; Ayroldi et al., 2012**).

Les glucocorticoïdes (GC) sont les agents anti-inflammatoires et immunomodulateurs les plus couramment utilisés. Leur valeur thérapeutique est énorme dans un large éventail de maladies auto-immunes / inflammatoires, et ils sont largement utilisés pour traiter les inflammations aiguës et chroniques, y compris la polyarthrite rhumatoïde, la maladie intestinale inflammatoire, la sclérose en plaques, le psoriasis et l'eczéma, ainsi que dans le traitement de certaines leucémies et dans les régimes immunosuppresseurs après une greffe d'organe. (**Barnes et Adcock, 1998 ; Riccardi et al., 2000 ; Rhen et Cidlowski, 2005 ; Simons, 2008 ; Coutinho et Chapman, 2011**).

Les GCs inhibent plusieurs événements initiaux d'une réponse inflammatoire. De manière aiguë, les glucocorticoïdes inhibent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité

vasculaire à la suite d'une agression inflammatoire et diminuent l'émigration des leucocytes vers les sites enflammés, effets qui nécessitent une nouvelle synthèse protéique (**Perretti et Ahluwalia, 2000**).

Le mode d'action des GCs est essentiellement génomique ; ils répriment la transcription de nombreux gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines, les molécules d'adhésion cellulaire et les enzymes clés impliquées dans l'initiation et / ou le maintien de la réponse inflammatoire hôte (**Coutinho et Chapman, 2011**).

I.1.3.3. Anti-inflammatoires naturels

De nombreuses maladies ont été décrites comme étant associées à des processus inflammatoires. La thérapie anti-inflammatoire actuellement disponible est souvent inefficace ou provoque des effets secondaires intolérables. Ainsi, de nouvelles substances anti-inflammatoires sont encore nécessaires d'urgence.

Les plantes ont été la première source de remèdes dans l'histoire de l'humanité. Depuis leur caractérisation chimique au 19^{ème} siècle, les composés bioactifs à base de plantes ont alimenté le développement de médicaments. De même, de nos jours, de nouveaux agents dérivés de plantes enrichissent continuellement notre arsenal de médicaments par exemple, la vincristine, la galantamine et l'artémisinine (**Fürst et Zündorf, 2014**).

Les composés phénoliques sont un groupe hétérogène de composés dérivés du métabolisme secondaire des plantes. Structuellement, les composés phénoliques ont au moins un cycle aromatique auquel un ou plusieurs groupes hydroxyle, liés à des structures aromatiques ou aliphatiques. Ils peuvent être groupés en flavonoïdes et non flavonoïdes (**Bravo, 1998**).

(1) Les flavonoïdes sont composés de deux cycles aromatiques liés par un hétérocycle d'oxygène. Ils peuvent être sous classés en tant que flavonols, flavones, isoflavones, anthocyanes, flavanols, flavanones, selon le degré d'hydrogénation et le remplacement de l'hétérocycle. Les flavonoïdes se trouvent généralement dans la nature sous forme de glycosides.

(2) Les non-flavonoïdes ; l'acide benzoïque et cinnamique sont deux des composés les plus représentatifs, et ils sont communément appelés acides phénoliques qui sont autres que les stilbènes, les tanins et les lignines (**Tanigawa et al., 2007**)

Ces dernières années, les composés phénoliques ont suscité un intérêt croissant pour la science et l'industrie alimentaire pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Les données

épidémiologiques ont associé un apport élevé d'aliments riches en phénols à un taux réduit de maladies chroniques telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et l'inflammation (**Bravo, 1998 ; Mohamed, 2014**).

Dans ce sens, un ensemble substantiel de preuves obtenues à la fois d'études in vivo et in vitro soutient le concept selon lequel les composés phénoliques agissent de la même manière que les AINS. Les polyphénols peuvent exercer des effets anti-inflammatoires notamment par le piégeage radicalaire, la régulation des activités cellulaires dans les cellules inflammatoires et la modulation des activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique (AA) notamment la phospholipase A2, cyclooxygénase et le métabolisme de l'arginine (NOS) (**Santangelo et al., 2007 ; Hussain et al., 2016**). Certains d'entre eux inhibent d'autres médiateurs pro-inflammatoires en plus de la cyclooxygénase en inhibant leur activité ou l'expression des gènes. Outre, certains composés phénoliques peuvent augmenter et /ou diminuer les facteurs transcriptionnels, comme le facteur nucléaire kB (NF-kB) ou Nrf2, dans les voies inflammatoires et antioxydantes (**Calixto et al., 2004 ; Maroon et al., 2010; Sergent et al., 2010 ; Cardozo et al., 2013**).

Une étude in vivo menée par **Chen et al (2012)** a démontré que l'extrait des fleurs de thé (TEE), riche en polyphénols tel que le gallate d'épigallocatechine (EGCG), épigallocatechine (EGC) et épicatechine (ETC), possède un effet anti-inflammatoire contre l'inflammation chronique. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'administration orale de TEE chez la souris est associée à une réduction significative de l'inflammation aiguë (hépatique) tissulaire en bloquant l'expression des cytokines (TNF-alpha, IL-1 β) et la production de NO.

Récemment, un intérêt croissant pour l'effet bénéfique de l'huile d'olive extra-vierge (EVOO) est principalement focalisé sur l'effet anti-inflammatoire des composés phénoliques présents dans l'EVOO. L'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol sont les principaux composants phénoliques de l'EVOO et ont pu inhiber l'inflammation en bloquant les enzymes de production des eicosanoïdes (prostaglandine I2, leucotriène B4) comme la COX-2, la lipoxigénase (LOX) et la phospholipase A2 (PLA2) dans des cellules animales et humaines (**Santangelo et al., 2007**).

Les polyphénols présents dans le vin rouge et le thé noir, par exemple la quercétine, l'EGCG, l'EGC et les flavines, sont capables d'inhiber la COX-2 et la LOX de manière dose-dépendante après application aux cellules macrophages murins (RAW 264) activées par le

LPS (**Ichikawa et al., 2004**). De même, le kaempférol, un flavonoïde largement distribué dans de nombreuses sources naturelles, notamment les pommes, le raisin, le chou et la tomate, réduit considérablement l'inflammation en inhibant la production de PGE2.

Par ailleurs, des chercheurs ont montré que les polyphénols du cacao (flavonols, anthocyanidines, catéchines, etc.) diminuent l'inflammation par de nombreux mécanismes tels que l'inhibition de l'activation des cellules T induite par les mitogènes et l'expression réduite de l'IL-2 et d'autres cytokines (IL-6, TNF-alpha) (**Andújar et al., 2012 ; Ambriz-Pérez et al., 2016**). La curcumine a été identifiée comme un composant actif naturel isolé du rhizome de la plante *Curcuma longa*, avec un large éventail d'effets médicaux contre de nombreuses maladies chroniques comme les maladies cardiaques vasculaires, le cancer et les troubles métaboliques en raison de sa forte réponse antioxydante et anti-inflammatoire in vitro et in vivo (**Veres, 2012**). **Aggarwal et Harikumar (2009)** ont rapporté que l'application orale de 70-100 mg/kg de curcumine réduit la réponse inflammatoire systémique (plasma) et tissulaire (tissu aortique) ainsi que l'oxydation des LDL et les effets hypocholestérolémiants chez les rongeurs. De même, **Nemmar et al (2012)** ont montré que la supplémentation de la curcumine en gavage oral (45mg/kg) chez les souris mâles réduit significativement l'inflammation systémique en empêchant la libération de TNF- α et de la protéine C-réactive (CRP).

Chapitre II.

Stress oxydant et antioxydants

I.2. Stress oxydant

Élément indispensable à notre survie, à notre vie, à notre développement, à notre capacité d'adaptation ; l'oxygène est également à l'origine de toxicité, d'acidité, d'altération, de dégénérescence. En effet, le métabolisme de l'oxygène, lorsqu'il est dérégulé, peut entraîner de part ce que l'on appelle « le stress oxydant » (**Koechlin-Ramonatox, 2006**).

Il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN). Radicalaires ou non radicalaires, elles sont produites en permanence par plusieurs types cellulaires dans les organismes aérobies (**Swain et al., 2002; Baudin, 2006**).

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (**Koechlin-Ramonatox, 2006**).

I.2.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, un atome ou une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés (**Li et al., 2016 ; Dasgupta et Klein, 2014**), ils peuvent être chargés ou non chargés (**Kerher et Klotz, 2015**). Les radicaux libres peuvent être générés à partir de nombreux éléments, mais dans les systèmes biologiques, ce sont ceux impliquant l'oxygène et l'azote qui sont les plus importants (**Burton et Jauniaux, 2011**) ; soit par scission homolytique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit par scission hétérolytique où un atome reçoit deux électrons lorsque les liaisons covalentes sont brisées. Et également, au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (**Dasgupta et Klein, 2014 ; Halliwell et Gutteridge, 2015**).

Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Les radicaux libres oxygénés ou, plus généralement, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), ainsi que les espèces réactives de l'azote (ERN), sont des produits du métabolisme cellulaire normal (**Valko et al., 2007**).

I.2.2 Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites à partir d'oxygène moléculaire comme résultat du métabolisme cellulaire normal (**Ozougwu, 2016**). Cette appellation inclut

les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote ...etc) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires (Tableau 01)

Tableau 01 : Les principales espèces réactives de l'oxygène générées dans les systèmes biologiques (Nimse et Pal, 2015 ; Dutta, 2016 ; Ozougwu, 2016)

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	$\cdot OH$
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}
Radical alcoxyde	RO^{\cdot}
Monoxyde d'azote	NO
Radical tétrachlorure de carbone	CCl_3
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	HOCl
Oxygène singulier	1O_2
Peroxynitrite	ONOO
Ozone	O_3

I.2.3. Production des radicaux libres

L'accumulation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) peut être déclenchée par des facteurs exogènes et / ou endogènes (Silva et Coutinho, 2010), comme résumé dans la figure 2.

I.2.3.1. Production intracellulaire (endogène)

La production des ERO dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles mais essentiellement d'origine enzymatique.

I.2.3.2 Production extracellulaire (exogène)

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non genotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes...). Les rayonnements UV induisent la synthèse de l'intermédiaire d'agents photosensibilisants.

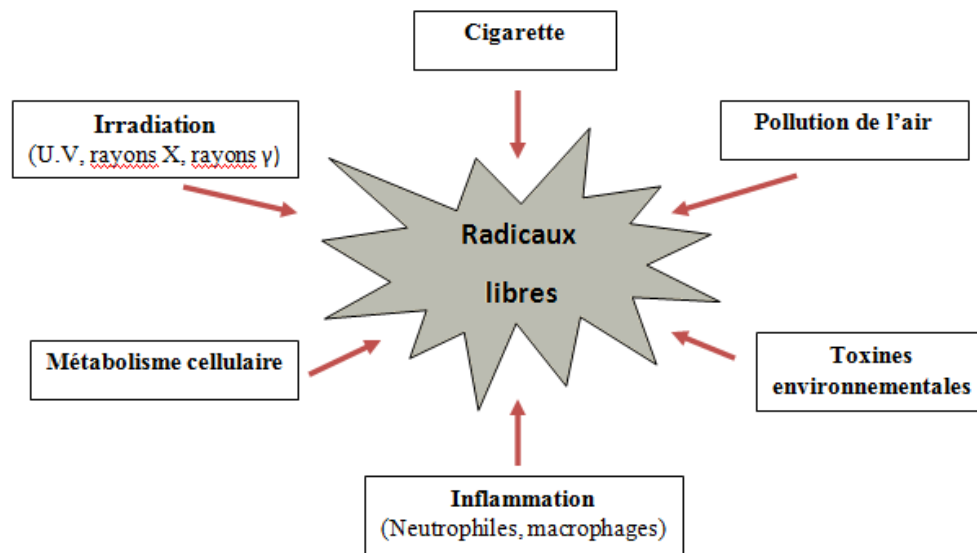
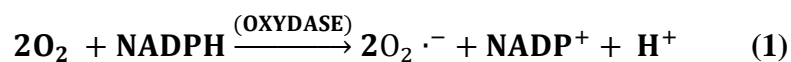


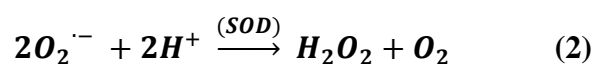
Figure 02: Résumé des sources exogènes et endogènes de radicaux libres.

I.2.4. Production des radicaux libres oxygénés et azotés

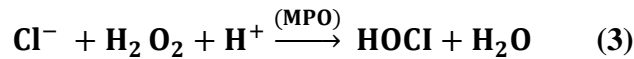
La génération des ERO (Tableau 01) commence par une molécule d'oxygène, l'activation de la NADPH-oxydase et la production du radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$, eqn (1)) (Nimse et Pal, 2015)



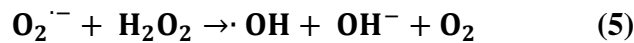
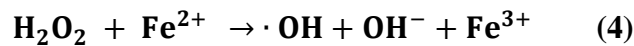
L' $O_2^{\cdot -}$ est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (eqn (2)) par la SOD ;



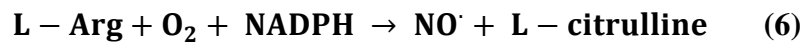
Les espèces réactives peuvent également être générées par le système myéloperoxydase-halogénure-H₂O₂. L'enzyme myéloperoxydase (MPO) est présente dans les granules cytoplasmiques des neutrophiles. En présence de l'ion chlorure, qui est omniprésent, H₂O₂ est converti en hypochlorure (HOCl, eqn (3)), un oxydant puissant et également un agent antimicrobien.



La formation de ·OH dépend à la fois d'O₂^{·-} et H₂O₂ par les réactions de Fenton (eqn (4)) et /ou Haber-Weiss (eqn (5)). Par conséquent, sa formation est soumise à une inhibition par la SOD et la CAT (Sharma et al., 2012).



Par ailleurs, les NO-synthétases (NOS) sont une famille d'enzyme qui transforment l'acide aminé L-arginine en L- citrulline et NO· (oxyde azotique) en présence de la NADPH (Toro et Rodrigo, 2009 ; Bouguerne, 2012 ; Nimse et Pal, 2015).



L'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) est capable de produire en continu une grande quantité de NO·, qui agit comme inhibiteur d'O₂^{·-}.

L'NO· et l'O₂^{·-} réagissent ensemble pour produire du peroxynitrite (ONOO⁻, eqn (7)), un oxydant très fort, donc, où chacun peut moduler les effets de l'autre. Bien que ni l'NO· ni l'O₂^{·-} ne soit un oxydant puissant, le peroxynitrite est un puissant oxydant polyvalent qui peut attaquer une large gamme de cibles biologiques (Nimse et Pal, 2015).



La surproduction de ces espèces réactives d'azote est appelée le stress nitrosatif. Cela peut se produire lorsque la génération des RNS dans un système dépasse la capacité du système à les neutraliser et à les éliminer. Le stress nitrosatif peut conduire à des réactions de nitrosylation qui peuvent altérer la structure des protéines et inhiber ainsi leur fonction normale (Valko et al., 2007).

I.2.5. Stress oxydant et ses conséquences biologiques

Le stress oxydatif a été impliqué dans plusieurs maladies incluant le cancer, l'athérosclérose, le paludisme, le syndrome de la fatigue chronique, la polyarthrite rhumatoïde et des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington. L'évidence indirecte via la surveillance des biomarqueurs tels que les espèces réactives d'oxygène, et la production d'espèces réactives d'azote, la défense antioxydante indique des dommages oxydatifs qui peuvent être impliqué dans la pathogenèse de ces maladies **(Rahman et al., 2012)**.

Le stress oxydatif contribue également aux lésions tissulaires après irradiation et hyperoxie, ainsi que dans le diabète et est susceptible d'être impliqué dans le développement du cancer lié à l'âge. L'infection par *Helicobacter pylori*, qui augmente la production des espèces réactives d'oxygène et d'azote dans l'estomac humain est également considéré comme important dans le développement du cancer gastrique **(Vasavidevi et al., 2006)**.

Les espèces réactives de l'oxygène ont également été signalés à endommager les composants cellulaires dans le cartilage en altérant les réponses des chondrocytes à des facteurs de croissance et de la migration vers les sites de lésion du cartilage menant à l'arthrose **(Vasavidevi et al., 2006)**. Il existe de plus en plus de preuve suggérant le rôle des ROS de causer des dommages les cellules β des îlots pancréatiques **(Haydent et Tyagi, 2002)**.

Par ailleurs, l'accru des ERO dans le cœur humain est associé à une sténose aortique, alors que l'excès d'ERO dans le rein humain conduit à une lithiase urinaire **(Rahman et al., 2012)**.

Il a également été observé que l'hyperglycémie déclenche la génération de ERO à la fois dans les cellules mésangiales et tubulaires des reins humains, ce qui entraîne des changements structurels et fonctionnels dans les glomérules causant la néphropathie diabétique **(Verzola et al., 2004)**. L'augmentation de la production de ERO en haute altitude peut également être associée au syndrome de mal de montagne aigu (AMS), à l'œdème pulmonaire à haute altitude (HAPE) et à l'œdème cérébral de haute altitude (HACE) **(Rahman et al., 2012)**.

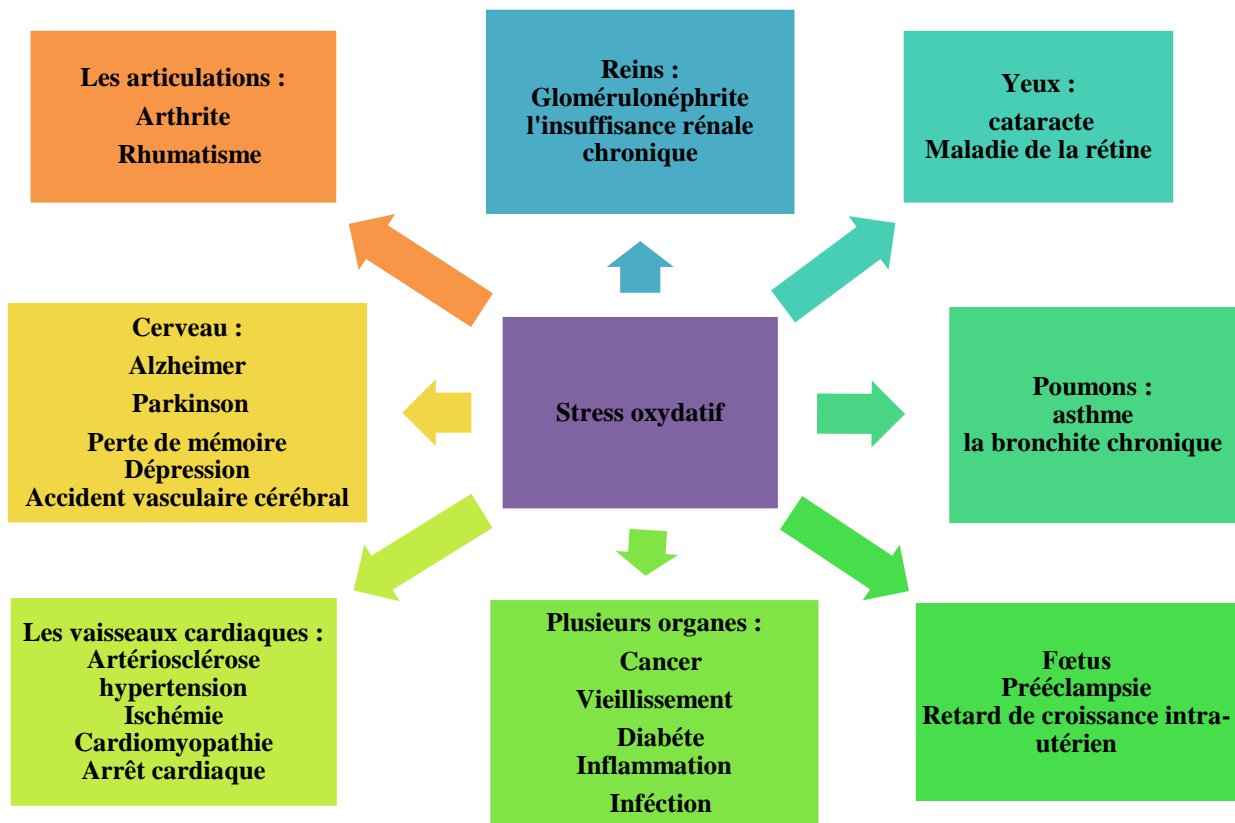


Figure 03 : Stress oxydatif et ses conséquences (Nagar et al., 2017)

I.2.6. Antioxydants

Les molécules ou microconstituants capables d'interférer avec les radicaux libres sont appelés antioxydants. L'exposition à des radicaux libres à partir d'une variété de sources conduit les organismes à développer une série de mécanismes de défense.

Ces derniers comprennent : (i) des mécanismes de prévention ; (ii) des mécanismes de réparation, (iii) des défenses physiques et (iv) les défenses antioxydantes (Valko et al., 2007).

Toutefois, il existe deux types de défenses antioxydantes (Figure 04) à savoir, les défenses antioxydantes enzymatiques qui comprennent : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx) (Valko et al., 2007), glutathion transférase (Birben et al., 2012), le couple thiorédoxine /thiorédoxine réductase (TRX), hème oxygénase et la peroxyrédoxine (PRX) (Pincemail et al., 2002 ; Halliwell, 2012), qui sont endogène à l'origine (Dasgupta et Klein, 2014).

Tandis que, les antioxydants non enzymatiques sont de petites molécules qui peuvent être soit soluble dans l'eau ou soluble dans les lipides. Certains de ces antioxydants dérivent de l'alimentation tels que les caroténoïdes, les flavonoïdes, les vitamines ; l'acide ascorbique

(vitamine C), α -tocophérol (vitamine E), vitamine A, glutathion (GSH), acide urique, bilirubine et des protéines (ferritine, transferrine, céruloplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation des ERO (**Dasgupta et Klein, 2014**).

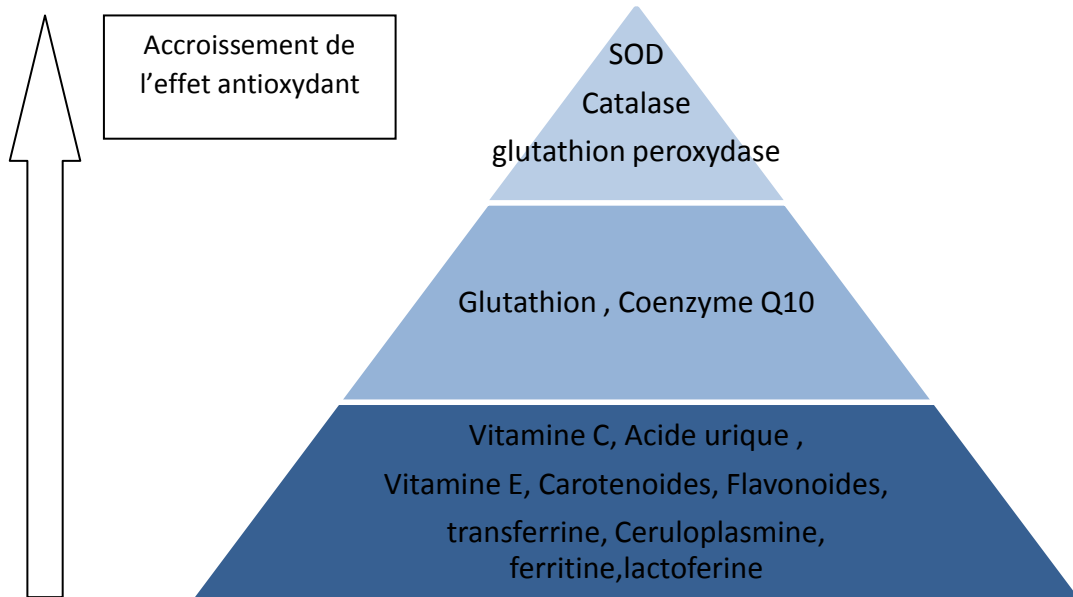


Figure 04 : l'efficacité des divers antioxydants dans le corps humain en neutralisant les radicaux libres (**Dasgupta et Klein, 2014**).

I.2.6.1. Défenses enzymatiques

I.2.6.1.1. Superoxydes dismutases (SOD, EC 1.15.1.1)

Les SOD constituent une importante famille de métalloenzymes (**Kerher et Klotz, 2015**) largement distribuées au sein des organismes aérobies dont elles assurent la survie. Elles catalysent la dismutation du radical superoxyde O_2^- en dioxygène et en H_2O_2 à une vitesse extrêmement importante (environ $2 \cdot 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) selon la réaction suivante :



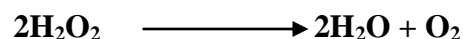
Cette réaction peut se faire spontanément mais de façon moins rapide, ce qui augmente le temps de vie de l' O_2^- lui permettant ainsi d'oxyder des composants cellulaires ou de générer des ERO bien plus toxiques tels que le peroxy-nitrite ou le radical hydroxyle. C'est pour cette raison, que cette enzyme a une fonction importante dans le système de défense contre les radicaux libres.

Chez les mammifères, la grande majorité de cette activité se situe au niveau intracellulaire dans les deux compartiments cytosoliques et mitochondriaux (**Kerher et Klotz, 2015**). Ces enzymes comprennent une forme de cuivre-zinc (CuZnSOD, trouvée dans le cytoplasme de la cellule et dans l'espace intermembranaire des mitochondries), une isoenzyme de manganèse (MnSOD, d'origine bactérienne, située dans la matrice mitochondriale) et une forme extracellulaire de la SOD (EC-SOD), une glycoprotéine qui contient également du Cu et du Zn. Ces trois enzymes sont codées par trois gènes nucléaires différents appelés SOD1, SOD2, SOD3 (**Zelko et al., 2002 ; Turrens, 2010**).

I.2.6.1.2. Catalases

La catalase est une enzyme présente dans les cellules des plantes, des animaux et des bactéries aérobies (**Flora, 2009**). Elle est exprimée dans tous les principaux organes du corps en particulier dans le foie, les reins et les érythrocytes où elle joue un rôle essentiel dans la défense des cellules contre le stress oxydatif. Cette protéine est principalement localisée dans un organite cellulaire appelé le peroxysome mais une catalase fonctionnelle a également été détectée dans le cytoplasme, dans les mitochondries des cardiomyocytes de rat et sur la membrane cytoplasmique des cellules cancéreuses humaines (**Nishikawa et al., 2009 ; Glorieux et al., 2015**).

Cette enzyme catabolise le produit final de la réaction de dismutation, à savoir l' H_2O_2 , en molécule d'eau et en oxygène moléculaire (**Flora, 2009 ; Rajendran et al., 2014**).

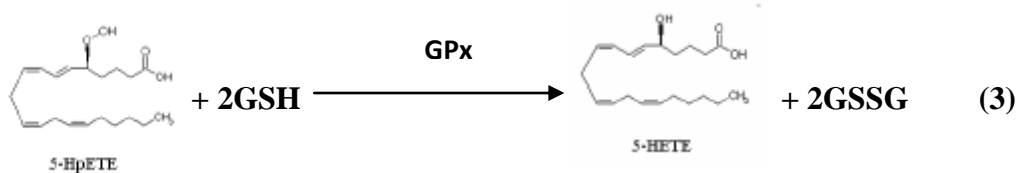
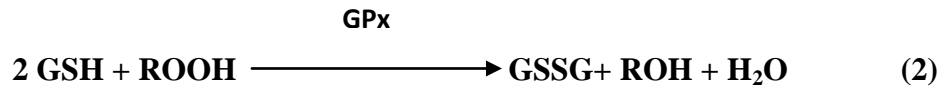
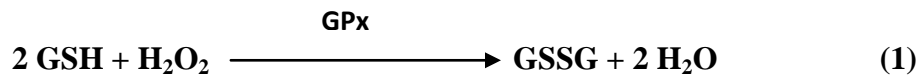


Par ailleurs, lorsque les peroxysomes sont endommagés et la quantité de catalases diminue, une augmentation de la libération de H_2O_2 dans le cytosol, peuvent contribuer au stress oxydatif dans la cellule (**Kim et al., 2015**).

I.2.6.1.3. Peroxydases

Les systèmes de défense enzymatiques primaires au niveau cellulaire contre les dommages causés par les ERO, tels que le peroxyde d'hydrogène et l'hydroperoxyde lipidique, sont le cycle redox du glutathion, le cycle de la thiorédoxine et la catalase (**Sakamoto et al., 2014**). Les glutathions peroxydases (GPx ; EC1.11.1.9 et EC 1.11.1.12) sont des enzymes à sélénium ayant la propriété de catalyser la réduction du H_2O_2 (réaction 1) et des hydroperoxydes organiques formés par l'oxydation des acides gras (réaction 2 et 3) en eau ou en alcool

correspondant, respectivement, en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (**Herbette et al., 2007 ; Margis et al., 2008**)



Les GPx sont des enzymes sélénium-dépendantes ou sélénium-indépendantes (**Sakamoto et al., 2014**). Exprimée par la plupart des eucaryotes, cette famille compte ; huit enzymes GPxs chez l'humain (GPx1- GPx8), huit chez la souris (GPx1-GPx8), un seul chez la mouche *Drosophila melanogaster* (PHGPx) et trois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (GPx1p-GPx3p) (**Inoue et al., 1999; Li et al., 2003 ; Brigelius-Flohe et Maiorino, 2013**).

Parmi, les huit isoformes de GPx connus, cinq sont des sélénoprotéines (GPx 1-4 et GPx6). Tandis que, GPx5, GPx7 et GPx8 sont des non-sélénoprotéines (**Lei et al., 2015 ; Chen et al., 2016**).

GPx1 se trouve au niveau des érythrocytes et d'autres tissus, ayant pour rôle la protection de ces cellules contre les effets nocifs de H₂O₂ (**Khan et al., 2014**). Certains auteurs rapportent que différents types de maladies ont été signalés en raison soit d'une sur ou une sous-expression de GPx1 comme l'hyperglycémie, l'hyperbilirubinémie et l'obésité (**McClung et al., 2004 in Khan et al., 2014**).

GPx2 est principalement exprimée dans le système gastro-intestinal, y compris l'épithélium de l'oesophage et, dans le foie chez les humains. Il a été, par conséquent, nommé GI-GPx ou GPx-GI. **Chu et ses collaborateurs (1993)** suggèrent que le GPx2 agirait comme une barrière contre l'absorption des hydroperoxydes d'origine alimentaires.

GPx3 est mitochondrial, alors que GPx4 est présent dans le noyau, le cytosol, la mitochondrie et liée également aux membranes (**Margis et al., 2008**). Elle abaisse le niveau des hydroperoxydes dans les cellules. Comme, elle est responsable de la réduction de plusieurs types d'inflammations (**Papp et al., 2007**), la maturation des spermatozoïdes et de la motilité (**Kriska et al., 2008**).

Quant au GPx5, elle a un emplacement bien spécifique dans l'épididyme jouant un rôle important dans la fertilité et aide le développement embryonnaire (**Zhang et al., 2008**).

GPx6 est un SecGPx chez l'homme, mais un CysGPx chez les rongeurs et autres animaux. Il se trouve dans le bulbe olfactif et depuis sa découverte, a été suspectée pour compléter le système sensoriel olfactif. Toutefois, son rôle précis reste à élucider (**Hatfield et al., 2011**).

Outre ces isoformes, il y a également deux autres isoformes (GPx7 - GPx8) dernièrement découvert et donc parmi les plus mystérieux en termes de fonctions. Des études évolutives suggèrent qu'ils proviennent de la SecGPx4. Ils se trouvent dans le réticulum endoplasmique, avec des fonctions de suppresseur de tumeurs par le biais de la régulation des principales molécules de signalisation du cycle cellulaire (**Bosello-Travain et al., 2015**).

Le rôle de la GPx est très important dans la plupart des tissus (**Richard et al., 1997**), par exemple dans les globules rouges et les plaquettes où elle réalise la totalité de l'élimination de H₂O₂. Il faut enfin souligner que l'activité mesurée de la GPx érythrocytaire est un bon reflet de la carence en sélénium plasmatique ou érythrocytaire (**Néve, 1991**). La GPx plaquettaire est également un bon indicateur du statut sélénium mais les étapes nécessaires à l'isolement sont délicates.

1.2.6.1.4. Thiorédoxine (Trx) /thiorédoxine réductase (TrxR)

Le système des thiorédoxines se compose d'un donneur d'électrons et deux types de protéines oxydoréductases : la thiorédoxine (Trx), la thiorédoxine réductase (TrxR) et le NADPH comme donneur d'électrons. C'est un important système de disulfure-réductase qui peut fournir des électrons à une large gamme d'enzymes (**Silva-Adaya et al., 2014 ; Lu et Holmgren, 2014**).

La thiorédoxine est présente dans toutes les espèces, des archées à l'homme (**Holmgren et Bjornstedt, 1995**). C'est une petite protéine redox ubiquitaire, de faible masse moléculaire (12 kDa) dont le site actif est caractérisé par deux résidus [cystéine](#) (Cys32 et Cys35), séparés

par deux [acides aminés](#) -Cys-Pro-Gly-Cys- (**Yoshihara et al., 2010**). Elle joue un rôle important dans la réponse cellulaire, y compris la croissance cellulaire, le cycle cellulaire, l'expression du gène et l'apoptose, afin de maintenir l'équilibre redox. En outre, la régulation redox par la thiorédoxine est impliquée dans la pathogenèse de divers troubles associés au stress oxydatif tels que le cancer et les maladies neurodégénératives (**Burke-Gaffney et al., 2005 ; Dasgupta et Klein, 2014**).

Une fois oxydée, la thiorédoxine qui présente dans son site actif un pont disulfure sera réduite en deux groupements thiol, en présence de NADPH, H⁺ par la thiorédoxine réductase. Cette dernière est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif et intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (**Hattori et al., 2002 in Bouguerne, 2012**).

Toutefois, les thiorédoxines réduites permettent la réduction de disulfures protéiques (**Arner et Holmgren, 2006 ; Holmgren et Lu, 2010**).

Dans les cellules de mammifères, les thiorédoxines et les thiorédoxines réductases sont exprimées sous forme de trois isoformes : Trx1 et TrxR1 sont cytosoliques, Trx2 et TrxR2 sont mitochondriales et Sp-trx et TGR (ou TrxR3) sont exprimées dans les testicules chez les hommes. Contrairement aux TrxR1 et TrxR2, TGR est capable de réduire le glutathion oxydé, d'où sa dénomination de thiorédoxine/glutathion réductase TGR (**Soerensen et al., 2008 ; Arner, 2009; Holmgren et Lu, 2010 ; Silva-Adaya et al., 2014**).

I.2.6.1.5. Hème oxygénase

L'hème oxygénase (HO) est une enzyme ubiquitaire et essentielle pour tous les organismes eucaryotes qui dépendent de l'oxydation aérobie et du transport d'électrons par des protéines contenant de l'hème (**Abdureyim et al., 2011 ; Habtezion et al., 2011**). Elle catalyse la dégradation de l'hème par clivage oxydatif, pour produire des quantités équimolaires de biliverdine IX, de monoxyde de carbone (CO) et de fer (Fe²⁺). La Biliverdine IX est ensuite réduite à un puissant antioxydant, la bilirubine par la biliverdine réductase (BVR) (**Figure 05**), tandis que le fer libre est rapidement séquestré en ferritine, ce qui donne un autre antioxydant puissant (**Otterbein et Zuckerbraun, 2005 ; Origassa et Câmara, 2013 ; Tiwari et Ndisang, 2014**).

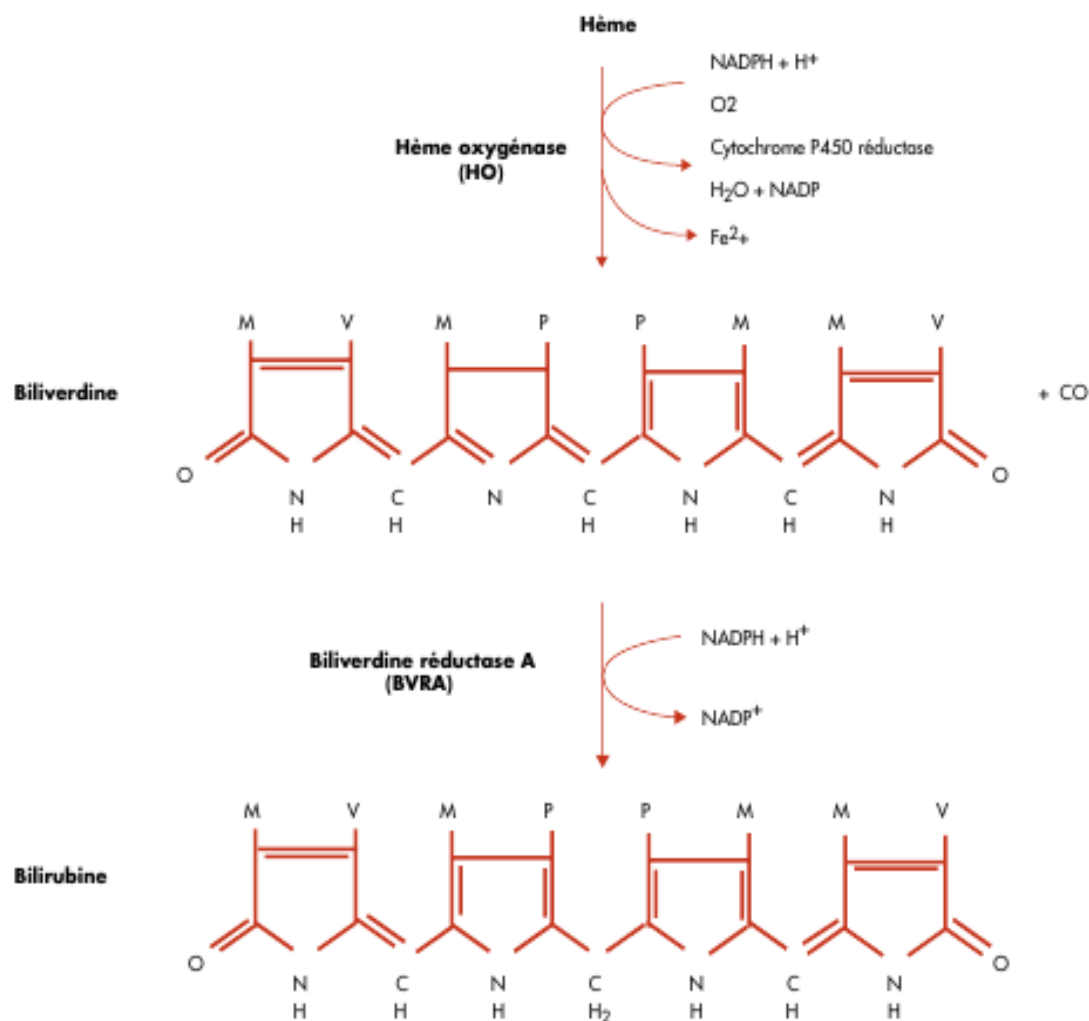


Figure 05: Catabolisme de l'hème : mode d'action de l'hème oxygénase et de la biliverdine réductase. La dégradation de l'hème par le « système » hème oxygénase (HO) comporte trois étapes successives d'oxygénation nécessitant un total de sept électrons fournis par le NADPH, par l'intermédiaire du cytochrome P450 réductase. Une des étapes d'oxygénation (non représentée sur la figure) comporte l'hydroxylation du carbone α -mésio de la porphyrine. L' α -mésiohydroxyhème obtenu réagit avec une nouvelle molécule d'O₂ qui libère le monoxyde de carbone (CO) et le verdohème. La réduction finale qui nécessite un dernier électron, libère l'ion ferreux (Fe²⁺) et la biliverdine. Cette dernière est réduite immédiatement en bilirubine par la biliverdine réductase en présence de NADPH. M: radical méthyl (-CH₃) ; V : radical vinyl (-CH=CH₂) ; P : radical propionyl (-CH₂-CH₂- COOH) (Lyouni et al., 2007).

Trois isoformes ont été caractérisées jusqu'à présent, mais seules HO-1 et HO-2 sont fonctionnelles (Lyouni et al., 2007). L'isoforme HO-1 est une protéine de 32-kDa induite en réponse au stress par différents agents prooxydatifs (environnementaux et pharmacologiques) tels que les ERO, l'hème ou l'hémoglobine, les métaux lourds, les radiations UV, les

cytokines, les facteurs de croissance (**Maurel, 2013**). De très nombreux travaux font état d'une action protectrice de HO-1. Sa surexpression est considérée comme ayant trois activités majeures : antioxydante, anti-inflammatoire, antiapoptique, antiproliférative et un effet immunomodulateur dans les cellules vasculaires (**Kim et al., 2011 ; Araujo et al., 2012 ; Agarwal et Bolisetty, 2013 ; Origassa et Câmara, 2013 ; Son et al., 2013 ; Liu et Qian, 2015**).

L'isoforme HO-2 est exprimée de façon constitutive et peut fournir une fonction tampon temporaire supplémentaire contre l'hème pro-oxydant par séquestration (via des sites de liaison à l'hème supplémentaires situés sur l'enzyme) (**Origassa et Câmara, 2013**). Elle est localisée au niveau mitochondries où elle régule probablement une variété de fonctions cellulaires. L'existence d'une troisième isoforme distincte de HO codé (HO-3) a été postulée, mais il est maintenant clair qu'il s'agit d'un pseudogène non codant (**Habtezion et al., 2011**). Les deux isoformes, HO-1 et HO-2, de cette enzyme catalysent la même réaction enzymatique, entraînant la dégradation de l'hème (**Waltz et al., 2011 ; Origassa et Câmara, 2013**).

I.2.6.1.6. Peroxyrédoxine

Les peroxyrédoxines (Prx) (EC.1.11.1.15) sont une famille de peroxydases à thiol qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les hydroperoxydes organiques (ROOH) et le peroxydinitrite ($OONO^{\cdot}$) par un mécanisme à deux étapes : une première étape commune à toutes les peroxydases à thiol est l'oxydation de leur Cys catalytique (Cp) conduisant à un intermédiaire acide sulfénique analogue à l'acide sélénénique des Gpx classiques ; cette étape est suivie d'une étape de régénération impliquant généralement des protéines de type Trx (**Nelson et al., 2011 ; Boukhenouna, 2014**). Elles sont exprimées de façon ubiquitaire, avec de multiples isoformes présents dans la plupart des organismes (par exemple, 3 isoformes chez *Escherichia coli*, 5 chez *saccharomyces cervisiae*, 6 chez l'homme et 9 chez *Arabidopsis thaliana*) (**Rhee, 2016**).

Plusieurs recherches rapportent qu'il existe trois classes de peroxyrédoxines, qui se distinguent par le nombre et la localisation de la Cystéine catalytique ; les 2-Cys Prxs typiques, qui sont homodimères, 2-Cys Prx atypiques, qui sont monomères, et 1-Cys Prxs. Les 2-Cys Prxs typiques et atypiques partagent un mécanisme de réaction similaire impliquant deux résidus Cys conservés, appelés peroxydés et résolvants, respectivement (**Wood et al.,**

2003; Rhee et al., 2005 ; [Hall et al., 2009](#) ; Puerto-Galán et al., 2013 ; Sharapov et al., 2014).

I.2.6.2. Défenses non enzymatiques

I.2.6.2.1. Vitamine E (α -tocophérol)

Le terme vitamine E désigne une famille de lipides neutres dérivés de plantes qui fonctionnent comme des antioxydants liposolubles et qui sont reconnue essentielle à la santé humaine (**Ulatowski et al., 2013**). L' α -tocophérol se trouve principalement dans les arachides, les amandes et les graines de tournesol, tandis que l' γ -tocophérol est la principale vitamine E dans les noix, les noix de pécan, les pistaches et les graines de sésame (**Jiang, 2014**). L' α T et γ T existent dans différentes huiles végétales issues de l'olive, l'arachide, du maïs, du tournesol, du soja ou encore de la sauge et du romarin. Néanmoins, c'est la forme α qui est la plus abondante dans la nature et la plus étudiée à l'heure actuelle (**Boccardi et al., 2016**).

Elle est connue pour agir en tant qu'antioxydant *in vivo*. Présente dans les cellules vivantes, elle participe activement à l'inhibition des radicaux libres impliqués dans les processus d'oxydation des tissus. Elle est également considérée comme le principal inhibiteur de la peroxydation lipidique et a été utilisée pour stabiliser des polymères (**Rizvi et al., 2014**).

I.2.6.2.2. Vitamine C

L'acide ascorbique ou vitamine C est un antioxydant hydrosoluble qui joue un rôle essentiellement protecteur (**Gallie, 2013**). Bien que la plupart des plantes et des mammifères puissent synthétiser de l'ascrobate (Asc) *in vivo* à partir du glucose, les humains (ainsi que d'autres primates, chauve-souris et cobayes) sont incapables de produire de la vitamine C suite à une mutation du gène codant L-gulonogamma-lactone oxydase, l'enzyme responsable de catalyser la dernière étape de la voie de biosynthèse de la vitamine C (**Lachapelle et Drouin, 2011 ; Telang, 2013**).

Il peut être d'origine naturelle (fruits et légumes) ou synthétisé. L'acide ascorbique est un éliminateur de radicaux libres. De plus, il régénère la vitamine E dans les membranes cellulaires en combinaison avec le GSH ou des composés capables de donner des équivalents réducteurs (**Nimse et Pal, 2015**). C'est un donneur d'électrons, de ce fait, il est appelé antioxydant car, en faisant don de ses électrons, il empêche les autres composés d'être oxydé. Cependant par la nature même de cette réaction, la vitamine C est elle-même oxydée dans le

processus. La perte d'électron de la vitamine C se produit séquentiellement. L'espèce formée après la perte d'un électron est un radical libre, l'acide semi-déhydroascorbique ou le radical ascorbyle. Par rapport à d'autres radicaux libres, le radical ascorbyle est relativement stable avec une demi-vie de 10^{-5} secondes et assez non réactif, lors de la perte d'un second électron, le composé formé est l'acide deshydroascorbique (**Padayatty et al., 2003 ; Marakala, 2015**).

I.2.6.2.3. Vitamine A

Le potentiel antioxydant de la vitamine A a d'abord été décrit par **Monaghan et Schmitt (1932)**, qui ont rapporté que la vitamine A peut protéger les lipides contre le rancissement. Plusieurs revues scientifiques ont décrit les caractéristiques structurales et métaboliques de base de la vitamine A et des informations sur son potentiel en tant qu'antioxydant par rapport aux maladies cardiaques. La vitamine A a une contribution antioxydante vitale dans la protection des LDL humaines contre l'oxydation stimulée par le cuivre (**Nimse et Pal, 2015**).

I.2.7. Antioxydants phénoliques

I.2.7.1. Flavonoïdes

Flavonol (exp. quercétine, myricétine **1**), flavone (exp. apigenin, lutéoline **2**), favonolols (exp. Taxifoline **3**), flavan-3-ols (exp. catéchine, épigallocatechine **4**), flavonone (exp. l'hespérétine, la naringénine **5**), l'anthocyanidine (exp. la cyanidine, la delphidine **6**), l'isoflavone (exp. la génistéine, la daidzéine **7**).

Les flavonoïdes sont un groupe de dérivés naturels du benzo- γ -pyran (**1-7**) qui possèdent de puissantes activités antioxydantes. Les flavonoïdes largement distribués dans les fruits et les légumes ont des effets biologiques multiples, comprenant l'activité anti-radicalaire. Il a été rapporté que les flavonoïdes ont un effet protecteur sur les lésions de l'ADN induites par les radicaux hydroxyles. L'un des mécanismes qui explique l'effet protecteur des flavonoïdes sur l'ADN est l'implication des ions métalliques chélatants comme le cuivre ou le fer. Les flavonoïdes complexés avec le cuivre ou le fer empêchent la génération du ROS (**Rice-Evans et al., 1996 ; Pietta, 2000 ; Zhou et al., 2001 ; De Souza et De Giovanni, 2004 ; Nimse et Pal., 2015 ; Kurutas, 2016**).

I.2.7.2. Caroténoïdes

(I) Carotines : le lycopène, le β -carotène, (II) Xanthophylle : zéaxanthine, lutéine. Les caroténoïdes sont parmi les plus courants phytonutriments solubles dans les lipides (**Stahl et Sies, 2003 ; Muller et Boehm, 2011**).

Le lycopène et le β -carotène sont les caroténoïdes les plus importants parmi les 600 autres composés (**Olson et Krinsky, 1995**).

Les caroténoïdes sont bien connus pour éliminer les radicaux peroxydes plus efficacement par rapport à tout autre ROS. Les radicaux peroxydes générés dans le processus de peroxydation lipidique peuvent endommager les lipides dans la paroi cellulaire. Le piégeage des radicaux peroxydes peut perturber la séquence réactionnelle et empêcher les dommages aux lipides cellulaires. Les longues chaînes alkyles insaturées des caroténoïdes les rendent hautement lipophiles. Les caroténoïdes sont connus pour jouer un rôle important dans la protection des membranes cellulaires et des lipoprotéines contre les ROS en raison de leur activité de piégeage de radical peroxyde (**Sies et Stahl, 1995 ; Stahl et Sies, 2003**).

I.2.8. Antioxydants synthétiques

L'anhydride sulfureux (ou dioxyde de soufre SO_2) et ses combinaisons minérales ont été utilisés comme premiers antioxydants des vins et des bières, mais ces composées possèdent un caractère fortement allergisant. L'utilisation des antioxydants synthétiques tels que le hydroxyanisole butylé (BHA) et le hydroxytoluène butylé (BHT) dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique, est actuellement remise en question en raison des risques toxicologiques de ces deux composés. Ces antioxydants sont suspectés à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes.

I.2.9. Antioxydants naturels

Les plantes médicinales sont une source importante d'antioxydants. Les antioxydants naturels augmentent la capacité antioxydante du plasma et réduisent le risque de certaines maladies comme le cancer, les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux. Les métabolites secondaires tels que les phénoliques et les flavonoïdes provenant des plantes ont été signalés comme étant de puissants pièges à radicaux libres.

Ils se trouvent dans toutes les parties des plantes, telles que les feuilles, les fruits, les graines, les racines et l'écorce. Il existe une grande variété d'antioxydants naturels qui sont différents dans leur composition, propriétés physiques et chimiques, mécanisme et site d'action (**Nagar et al., 2017**).

I.2.10. Mécanisme d'action des antioxydants

Deux mécanismes principaux d'action ont été proposés pour les antioxydants (**Lobo et al., 2010**). Le premier est un mécanisme de rupture de chaîne par lequel l'antioxydant primaire donne un électron au radical libre présent dans le système. Le second mécanisme implique l'élimination des ERO / initiateurs d'espèces réactives d'azote (antioxydants secondaires) par trempage de la chaîne d'initiation du catalyseur. Les antioxydants peuvent également exercer leur effet sur les systèmes biologiques par d'autres mécanismes qui peuvent inclure le don d'électrons, la chélation des ions métalliques, les co-antioxydants ou la régulation de l'expression des gènes (**Krinsky, 1992 ; Lobo et al., 2010 ; Nagar et al., 2017**)

Chapitre III.

Punica granatum L.

L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels et la forte incidence des effets secondaires qui leur sont associés ainsi que la difficulté d'accès et le coût élevé des médicaments dans certains pays expliquent le recours de plus en plus à la médecine naturelle pour se soigner. Ainsi, la troisième partie est consacrée à l'étude du grenadier, *Punica granatum*, plante native de l'Himalaya et cultivée depuis des siècles dans les régions méditerranéennes en étayant ses aspects ethnobotaniques et phytochimiques ainsi que ses vertus thérapeutiques particulièrement ses activités anti-inflammatoires et antioxydantes.

I. 3. Généralités sur l'espèce *Punica granatum* L. et de son fruit, la grenade.

I.3.1. Historique du grenadier

Le grenadier, *Punica granatum*, anciennement connu et apprécié de toutes les civilisations par sa beauté et la jutosité de son fruit antique doté de riches applications ethno-médicales (**Shah et al., 2011 ; Chadli et al., 2015**).

Les fruits du grenadier, avec leurs graines, écorces, fleurs et jus, ont été consommés durant des milliers d'années, en tant que nourriture et remèdes (**Holland et al., 2009 ; Smith, 2014**). Il est présent dans les anciens textes grecs, égyptiens, les textes bibliques, le Coran et dans les traditions populaires des différents pays bordant la Méditerranée.

Dans la Grèce antique, Perséphone, fille de Zeus et de Déméter, est enlevée par Hadès et pris dans la pègre. Après une longue période de jeûne, Perséphone mange sept graines d'une grenade du jardin des enfers. Ayant goûté la nourriture des morts, elle se condamne à devenir reine des enfers, et à passer six mois de l'année en ces lieux et six mois sur terre, reproduisant ainsi le cycle des saisons, l'alternance de l'été et de l'hiver. L'ingestion des graines de grenade ne conduit pas à la fertilité, mais à la stérilité cyclique (**Ruis, 2015**).

En Egypte, la grenade était considérée comme le fruit des dieux. Le symbole de la fertilité et de la richesse, en raison de l'abondance de ses graines et de sa forme ronde (**Ruis, 2015**).

Les grenades étaient aussi un symbole commun de la fertilité dans les rites des mariages bédouins, chinois, grecs, indiens, perses et romains, entre autres. Dans la tradition bouddhiste, la grenade est l'un des trois abondances, de même que la pêche et la main de Buddha, et elle représente l'abondance de la progéniture.

Dans le saint coran, les fruits comme le raisin, la datte, la figue, l'olive et la grenade sont des cadeaux et des fruits célestes de Dieu.

I.3.2. Présentation du grenadier

I.3.2.1. Etymologie

Le grenadier a d'abord été connu sous deux appellations latine ; *Malum granatum*, qui signifie pomme à grains et *Malum punicum* qui signifie pomme de Phénicie (**Stover et Mercure, 2007 ; Holland et al., 2009; Haque et al., 2015**).

Plus tard, le naturaliste Carl Von Linné nomma le grenadier, *Punica granatum* (**Ashton, 2006**) dont le qualificatif générique **Punica** fait allusion à la ville de Carthage, ville ancienne dans la banlieue nord de la Tunisie où poussaient les meilleurs grenadiers. Et celui spécifique **granatum**, signifie granuleux faisant référence à la multiplicité des grains contenus dans le fruit (**Stover et Mercure, 2007 ; Wald, 2009**).

Pour les peuples de l'antiquité, le grenadier avait des noms divers ;

- « **Dulim** ou **dulima** » des Perses (**Soni et al., 2012**),
- « **Anar, anardana** » des Hindous (**Chaudhari et al., 2014**),
- « **Roia, roa ou kodon** » des Grecs (**Valero et al., 2015**),
- « **Inhmn** ou **nhman** » des Egyptiens (**Goor, 1967**),
- « **Rimmòn** » des Hébreux (**Goor, 1967**),
- « **Rumman** » des arabes (**Stover et Mercure, 2007**) ;
- « **Thar'mant** » (**Kanoun et al., 2014**) ou « **Taroumant** » des berbères (**Quezal et Santa, 1963**).

I.3.2.2. Description botanique

a) Aspect général

Le grenadier forme naturellement un arbrisseau ou un sous-arbrisseau (**Faria et Calhau, 2010**). Un arbre adulte peut atteindre entre 5 et 10m de haut, touffu (**Hollande et al., 2009**), très ramifié depuis la base du tronc et il est plus ou moins épineux (**Figure 6, A**). Le tronc est tortueux, à écorce grisâtre qui se ramifie en branches irrégulières, légèrement épineuses au

sommet. Généralement, sa durée de vie est extrêmement longue (**Morton, 1987 in Fawole et Opara, 2013**).

b) Feuilles

Punica granatum est une espèce à feuilles caduques (**Hollande et al., 2009**). Elles sont de forme oblongues, opposées ou sous opposées, luisantes, étroites, entières et non stipulées, de 3 à 7cm de long et de 2cm de large selon les cultivars (**Hmid, 2013**). Au stade juvénile, les feuilles sont de couleur rougeâtre puis à la maturité, elles deviennent verdâtres (**Teixeira da Silva et al., 2013 ; Hollande et al.,2009 ; Ashton, 2006**).

Pande et Akoh (2016), rapportent que la plupart des variétés de grenadier ont des feuilles en paires traversant alternativement à angle droit, alors que certaines variétés peuvent avoir trois feuilles par noeud (disposés à 120°) et même quatre feuilles par noeud (deux feuilles opposées par nœud).

c) Fleurs

A maturité, les fleurs sont d'un rouge éclatant, pourpre ou grenat selon les variétés mesurant 3cm de diamètre et ayant cinq à huit pétales, souvent davantage sur les plantes cultivées (**Figure 6, B**). Leur nombre est généralement l'équivalent du nombre de sépales d'après les auteurs **Pande et Akoh (2016), Hmid (2013), Teixeira da Silva et al. (2013), Hollande et al. (2009)**.

D'aspect froissé et portées par un court pédoncule. Elles se trouvent soit, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches (**Hollande et al., 2009 ; Ashton, 2006**).

Le grenadier est une espèce monoïque qui développe sur le même arbre, des fleurs hermaphrodites fertiles en formes de vase et des fleurs males stériles avec des styles très courts et des ovaires atrophiées en forme de cloche (**Melgarejo et Salazar, 2003**).

La période de floraison est variable en fonction des variétés et des conditions géographiques. Elle se produit généralement entre Mars-Avril et Juin- aout. Elle dure jusqu'à 10- 12 semaines (**Fawole et Opara, 2013 ; Hmid, 2013**)

d) Fruits

Le fruit du grenadier, la grenade (**Figure 6, D**), est un balauste, baie complexe (**Chakass et al., 2007**) presque ronde et charnue de la taille d'une pomme ou d'une orange. Elle mesure entre 6 et 12 cm de large alors que le poids varie entre 200 et 650 grammes (**Holland et al., 2009; Pande et Akoh, 2016**).

Le péricarpe du fruit est une coque épaisse, de consistance dure, de saveur amère et astringente qui varie selon les cultivars poussant dans différentes régions du monde.

Il est très coloré, généralement de teinte brun-rougeâtre (**Chakass et al., 2007**) ou rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau lisse de teinte blanc-jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé de l'extérieur et d'un beau jaune à l'intérieur du fruit. **Erken et Kader (2011)**, indiquent qu'il existe plusieurs cultivars exceptionnels avec des écorces de fruits de couleur noire.

La baie renferme de nombreuses graines angulaires ou arilles (**Figure 6, E**). Le fruit contient en moyenne 600 graines pulpeuses, contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et nombreuses (**Evreinoff, 1957**). Toutes ces graines de couleur rouge et de teinte variable possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit. Ces graines peuvent être classées d'après leurs qualités gustatives en trois groupes : Acide (acidité supérieur à 2%), sucré-acide (acidité entre 1 et 2%) et sucré (acidité inférieure à 1%), ce dernier présentant parfois des graines à téguments entièrement charnus. Communément ces caractères sont considérés comme définissant trois variétés de la même espèce.

Toutefois, les arilles varient par la taille alors que les graines varient par leur dureté entre les différentes variétés. Les variétés connues sans pépins contiennent réellement des graines tendres (**Hollande et al., 2009**).

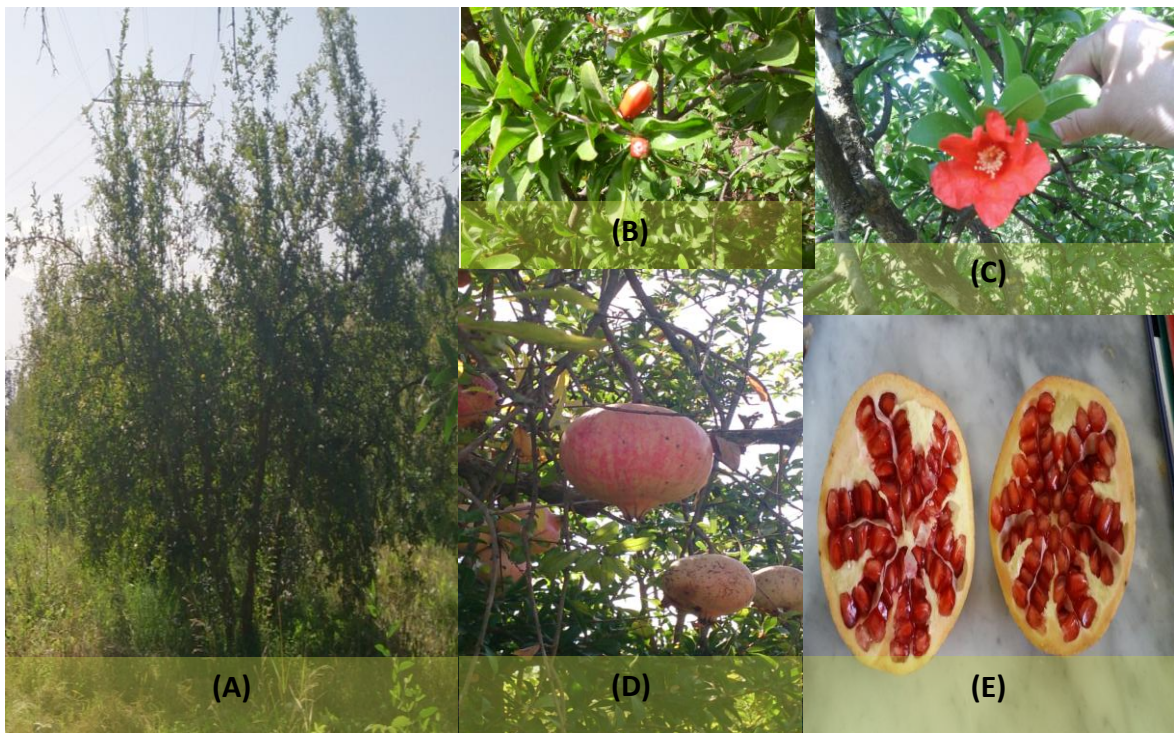


Figure 06 : Les différentes parties du grenadier. (A) l’arbre du grenadier. (B) bourgeon floral (C) fleurs du grenadier (D) les grenades (E) l’intérieur d’une grenade montrant la membrane, le mésocarpe et les arilles. (Originale, 2015)

I.3.2.3. Systématique

En botanique, il existe plusieurs systèmes de classification, la classification traditionnelle étant à distinguer de la classification APG (Angiosperm Phylogeny group).

Punica granatum n’appartient pas à la même famille selon le système de classification utilisé.

a) Classification de Linné

En 1753, le grenadier a été classé par Carl Von Linné (1707-1778) comme suit :

Règne	:	Plantae
Embranchement	:	Spermatophyta
Sous embranchement	:	Magnoliophyta
Classe	:	Magnoliopsida
Ordre	:	Myrtales
Famille	:	Punicaceae

Genre : Punica
Espèce : *Punica granatum*

La famille des Punicaceae, d'après **Melgarejo et Martínez (1992) ; Rana et al. (2010)**, est une famille monogénérique, c'est-à-dire qui contient un seul genre *Punica*. Ce dernier est représenté uniquement par deux espèces. D'une part, *Punica granatum*, et d'autre part, *Punica protopunica*, espèce endémique recensé sur l'île de Socotra au Yémen. Tandis que *Punica nana* est traitée comme étant la troisième espèce du genre *Punica* (**Teixeira da Silva et al., 2013**).

Cette famille (Punicaceae) constitue avec la famille des Myrtaceae, Lythraceae, Sonneratiaceae et celle des Melastomataceae, une relation phylogénétique étroite. A un certain moment, cette proximité est devenue la raison de la mise en relation consécutive du genre *Punica* L. avec certaines de ces familles (Myrtaceae, Lythraceae, Sonneratiaceae).

e) Classification APG III (2009)

Il s'agit de la troisième version de la classification moléculaire et cladistique des Angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, établi par l'*Angiosperms Phylogeny Group*, version revisitée de la classification APG de 1998 et APG II de 2003. Plus récente, cette classification réorganise le règne végétal en fonction des critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire du ribosome.

La classification APG III (2009) situe le grenadier comme suit :

Clade : Angiospermes
Clade : Dicotylédones vraies
Clade : Rosidées
Ordre : Myrtales
Famille : Lythraceae
Genre : Punica
Espèce : *Punica granatum*

I.3.3. Origine et aires de répartition du grenadier

Punica granatum L. est l'une des plus anciennes espèces d'arbres fruitiers cultivées ainsi que le figuier, l'olivier, le palmier dattier et la vigne (**Chandra et al., 2010**). Poussant de façon spontanée depuis plus de 4000 ans en Asie centrale, elle serait originaire de la perse (aujourd'hui l'Iran). Elle a été d'abord domestiquée dans la région Transcaucasie-Caspienne et la Turquie dans l'ère néolithique. Par la suite, dans l'Égypte ancienne, la Grèce et la péninsule italienne (**Levin, 2006 ; Chandra et al., 2010 ; Ben Abdennebi, 2012**).

Aujourd'hui, sa culture s'est propagée à travers le monde dans les zones subtropicales et tropicales en s'adaptant à des conditions climatiques variables et en indiquant ainsi, sa flexibilité, son adaptabilité et un large éventail de la diversité génétique (**Teixeira da Silva et al., 2013**).

Le grenadier est cultivé principalement en Iran, en Afghanistan, en Inde, en Chine et dans les pays du bassin méditerranéen (Tunisie, la Turquie, l'Égypte, l'Espagne et le Maroc) et notamment en Algérie. Toutefois, les plus importants producteurs de grenades sont les pays d'Orient dont l'Iran (production annuelle de 665000 tonnes), la Turquie, l'Inde mais aussi dans la zone méditerranéenne la Tunisie, le Maroc et l'Espagne qui est le principal pays producteur et exportateur de grenades de l'Union européenne (**Carbonell – Barrachina et al., 2012 ; Melgarejo-Sánchez et al., 2015**). Aux États-Unis et plus particulièrement en Californie, la culture de la grenade est également très développée (**Lansky et Newman, 2007**).

La grande diversité de cette espèce est évidente dans différents pays. En fait, l'Espagne abrite la banque de matériel génétique en Europe avec plus de 104 variétés alors que la plus riche est celle du Turkménistan, où il y a la station expérimentale de ressources phytogénétiques, créée en 1934, avec 1117 variétés (**Mars, 1998 in Hmid, 2013**).

I.3.4. Phytochimie de *P. granatum*

Le grenadier a été utilisé depuis longtemps dans la médecine populaire de nombreuses cultures pour la valeur nutritionnelle de ses fruits, les propriétés thérapeutiques des différentes parties de l'arbre, et son utilisation comme plante ornementale (**Chauhan et Kanwar, 2012**).

En fait, au cours de ces dernières années, le nombre de publications scientifiques liées aux propriétés bénéfiques du grenadier pour la santé, a considérablement augmenté fournissant

ainsi une base scientifique pour certaines utilisations en médecine traditionnelle (**Valero et al., 2015**).

Ces recherches indiquent que parmi un grand nombre de composés phytochimiques présents dans le fruit, les polyphénols, sont responsables de ces effets thérapeutiques.

En effet, la grenade constitue une source riche en deux types de composés phénoliques; d'une part, les anthocyanes tels que la delphinidine, cyanidine, pélargonidine-3-glucoside et le 3,5-diglucoside qui sont responsables de la couleur rouge du fruit et du jus. D'autre part, les tanins hydrolysables tels que punicaline, pédunculagine, punicalagine, acide gallagique et l'acide ellagique, qui représentent ainsi 92% de l'activité antioxydante du fruit entier (**Gil et al., 2000 ; Mena et al., 2011**). Rajoutant à cela d'autres composés tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes ainsi que la présence des sucres, des acides organiques (notamment, l'acide citrique, malique, tartrique, succinique, fumarique et ascorbique), des acides aminés, des stéroïdes et des sels minéraux tels que le calcium, le magnésium, le phosphore, le potassium et le sodium ; selon les différentes parties de la plante à savoir ; les écorces, les arilles, les graines, les feuilles, les fleurs et le jus de fruit (**Lansky et Newman, 2007 ; Shaygannia et al., 2016 ; Rahmani et al., 2017**).

En outre, la composition chimique du grenadier dépend du cultivar, de la région de culture, des conditions pédoclimatiques, du stade de maturité du fruit et des pratiques culturales (**Sreekumar et al., 2014 ; Pande et Akoh, 2016**)

I.3.5. Propriétés pharmacologiques

Toutes les parties du fruit du grenadier semblent avoir des propriétés thérapeutiques (**Tableau 02**). Certaines études rapportent que l'écorce, les racines, les feuilles, les fleurs et le tronc ont des effets médicaux bénéfiques sur certaines pathologies, principalement dans la prévention et le traitement du cancer par l'inhibition des facteurs pro-inflammatoires et les initiateurs de la tumeur et réduisent également la prolifération cellulaire (**Akpınar-Bayizit et al., 2012**), les maladies cardiovasculaires (effet anti-athérogène) (**Holland et al., 2009 ; Akpınar-Bayizit et al., 2012**), le diabète (**Sreekumar et al., 2014**), la maladie d'Alzheimer (**Jurenka et al., 2008**), le Sida (**Lee et Watson, 1998 ; Neurath et al., 2004**), la dysfonction érectile ainsi que des propriétés oestrogéniques (**Ahmed et al., 2013**).

En médecine Ayurvedique, le grenadier est considéré comme « une pharmacie en soi », il est utilisé pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. L'écorce et les racines sont utilisées traditionnellement pour traiter la dysenterie, les diarrhées, les ulcères et pour traiter les aphtes buccaux. Ils sont connus aussi pour leurs propriétés astringentes, vermifuges et anthelminthiques (**Lansky et Newman, 2007 ; Ben Abdennebi, 2012 ; Bhowmik et al., 2013**).

D'ailleurs, les auteurs **Nagaraju et Rao (1990)** de l'Inde, **Boukef et al. (1982)** de Tunisie, et **Caceres et al. (1987)** du Guatemala, indiquent que les écorces séchées étaient consommées en décoction dans de l'eau pour les mêmes affections citées précédemment. Des mélanges de pépins, jus et d'écorce de grenade ont paradoxalement montré des effets contraceptifs (**Gujral et al. 1960**).

Dans la médecine Unani, les fleurs de cette plante servaient de remède pour le diabète mellitus (**Saxena and Vikram 2004**). Plusieurs infusions ou décoctions des fleurs de la plante ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée simple et les pertes vaginales (**Shaygannia et al., 2016**).

Par ailleurs, certaines études démontrent l'efficacité du jus et des polyphénols présents dans le fruit du grenadier contre les infections virales d'origine alimentaires ainsi qu'un potentiel pour la prévention ou la réduction des infections à norovirus humains (**Su et al., 2010**). Le jus rafraîchissant du fruit de *Punica granatum* L. est recommandé pour guérir les maladies de la vésicule biliaire. Le fruit contient un tannin fort considéré comme une nutrition amère (**Shaygannia et al., 2016**).

Al-Zoreky (2009) a rapporté que 80% de l'extrait méthanolique de l'écorce du fruit est un puissant inhibiteur de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia Coli* et *Yersinia enterocolitica*.

Quant à **Albrecht et al. (2004)** ont montré que l'huile des pépins de grenade, ainsi que les polyphénols présents dans le péricarpe et du jus fermenté supprimerait la prolifération et l'invasion de plusieurs cellules cancéreuses de la prostate. L'huile de pépins de grenade a un potentiel comme agent de chimioprévention topique contre le cancer de la peau, principalement en raison de sa haute teneur en acide punique (**Hora et al., 2003**).

L'huile extraite de grenade peut efficacement interdire la production de prostaglandine ou de leucotriène par inhibition des enzymes eicosanoïdes de la cycloxygénase et de la lipoxygénase de sorte qu'elle peut augmenter l'application de l'huile ou de ses dérivés comme substances anti-inflammatoires internes ou externes (**Schubert et al., 1999**).

Toutefois, ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. Elles ont ainsi été investigués à grande échelle tant dans les modèles *in vitro* qu'*in vivo*, cependant les études chez l'homme restent peu nombreuses. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydantes, anti-carcinogéniques, anti-inflammatoires et antidiabétiques du grenadier.

Tableau 02 : Propriétés pharmacologiques des différentes parties du grenadier.

Partie de la plante	Activité / effet	Résultats de l'étude	Références
Jus	Amélioration de la mobilité des spermatozoïdes	La consommation de jus a montré une augmentation de la concentration de spermatozoïdes dans l'épididyme, de la mobilité des spermatozoïdes et de la densité des cellules spermatogènes.	(Türk et al., 2008)
Jus	Amélioration de la dysfonction érectile	L'apport de jus de grenade à long terme augmente le débit sanguin intracaverneux et améliore la réponse érectile	(Azadzoï et al., 2005)
Feuilles	antidiabétique	L'extrait éthanolique des feuilles a montré un effet antidiabétique remarquable	(Das et Barman, 2012)
Feuilles et écorces	Antidiabétique, hypolipédimique et antioxydant	Les feuilles et l'extrait de pelure de <i>P. granatum</i> possèdent des propriétés anti-diabétiques, hypolipédimiques et antioxydantes significatives	(Kartik et al., 2015)

Graines et écorces	Antidiabétique	L'extrait des graines et d'écorces a montré une réduction de l'augmentation de la glycémie induite par l'alloxane. L'extrait d'écorce a présenté une activité significativement meilleure que l'extrait de graines.	(Das et Sama, 2009)
Supplément de grenade	Neuro-protecteur	Les enzymes liées à la membrane ont été modifiées dans les régions du cerveau de souris Tg2576 traitées avec un régime témoin, et la supplémentation en grenade rétablit les activités des enzymes à des niveaux comparables aux valeurs notées dans les contrôles	(Braidy et al., 2013)
Ecorces	Protection contre la néphrotoxicité	L'administration d'écorce de fruits a montré une amélioration notable des anomalies liées à la néphrotoxicité.	(El-Habib, 2013)
fleurs	Protection contre la néphrotoxicité	L'extrait des fleurs du grenadier a un rôle protecteur et améliore la néphrotoxicité induite par la gentamicine	(El-Daly, 2016)

Deuxième partie

Matériel et Méthodes

Résultats et Discussion

Chapitre I.

Etude phytochimique du fruit de
Punica granatum L.

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Choix de la plante et localisation géographique

La plante utilisée dans le cadre du travail est *Punica granatum* L. variété Doux de Messaad. Ce choix est basé sur le fait qu'elle soit une variété locale.

L'identification de la plante est confirmée par la comparaison de nos échantillons avec ceux de l'herbier de l'Ecole nationale supérieure d'agronomie (ENSA) ex INA, El Harrach (Alger) où un spécimen de référence a été déposé.

Une partie de la plante a été étudiée, les fruits, récoltés au mois d'Octobre 2014 au troisième stade de maturation. Dans un verger de la commune de Beni Tamou, la Wilaya de Blida. La situation géographique de la station expérimentale est représentée dans la figure ci-dessous.



Figure 07 : Station de récolte du grenadier étudié (Google maps, 2018)

II.1.2. Collecte du matériel végétal

Nous avons récolté (15kg) de fruits au hasard de chacune des quatre orientations géographiques des arbres, tout en évitant les fruits les plus exposés au soleil et aussi ceux qui existent carrément en bas de l'arbre.

Après la récolte, les fruits sont immédiatement et soigneusement conservés dans un réfrigérateur à une température de 4°C, jusqu'au délai des analyses.

II.1.3. Critères pomologiques des grenades

Les fruits une fois récoltés, ont été soumis à un nettoyage à la main afin d'éliminer toute trace de poussière. Une fois le poids moyen (PM) de chaque fruit est déterminé, les grenades sont pelées manuellement puis les écorces et les arilles sont pesés séparément, pour déterminer le taux des arilles (RA) et des écorces (RE).

Le rendement en arilles (RA) et en écorces (RE) est calculé par les deux formules suivantes (Radunić et al., 2015) :

$$RA\% = \frac{\text{Poids des arilles (g)} \times 100}{\text{Poids du fruit entier (g)}}$$

$$RE\% = \frac{\text{Poids des écorces (g)} \times 100}{\text{Poids des fruits (g)}}$$

II.1.3.1. Extraction du jus de fruit de *Punica granatum*

Le jus extrait à partir des arilles est quantifié afin de déterminer le rendement. Il est calculé par la relation suivante (Hmid et al., 2013) :

$$RJ \% = \frac{PJ \times 100}{PA}$$

PJ : poids en (g) du jus extrait à partir des arilles.

PA : poids en (g) des arilles soumis à l'extraction.

II.1.3.2. Caractérisation chimique du jus frais de grenades

a) Mesure du pH

L'électrode du pH-mètre est plongée dans un bécher contenant 20ml d'échantillon à 20°C. L'opération est répétée trois fois. Le pH a été mesuré suivant la méthode de Hmid (2013).

b) Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable (AT) représente l'ensemble des acides organiques du jus, tels que les acides citrique, malique et tartrique. Elle est déterminée par titrage du jus par une solution titrée d'hydroxyde de sodium NaOH à 0.1 N, préparée par dissolution de 4g d'NaOH dans un litre d'eau distillée.

Nous avons procédé au titrage par méthode potentiométrique, en utilisant un potentiomètre de type Mettler-Toledo T50 dont le point final du titrage est repéré par pH-mètre (**Norme Européenne EN 12147,1996**).

Le calcul du taux d'acidité titrable de jus, se fait en utilisant la relation suivante :

$$AT\% = \frac{V \times (M \times 0,1N) \times f \times 100}{m}$$

- **V** : Volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium.
- **M** : Masse molaire de l'acide citrique (192,43).
- **N** : normalité de l'hydroxyde de sodium.
- **f** : facteur de correction.
- **m** : masse, en milligramme, de l'échantillon.

c) Détermination du taux des solides solubles

Le taux de solides solubles (TSS), exprimé en degré Brix, est déterminé à l'aide d'un réfractomètre à 20° C. Une goutte de jus de fruit a été mise sur la plaque du réfractomètre préalablement nettoyé et séché avec l'eau distillée. Le degré Brix a été lu directement sur l'échelle à l'intersection de la limite entre la frange claire et la frange foncée (**OCDE, 2005**). Trois déterminations sont effectuées sur le même échantillon analysé.

d) Indice de maturité

L'indice de maturité (IM) est donné par le rapport entre le degré Brix et l'acidité du jus (TSS/AT).

II.1.4. Préparation des extraits bruts

Les fruits ont été soumis à un pelage manuel. Les écorces sont mises aux conditions de séchages à l'abri de la lumière et de l'humidité, à une température ambiante pendant 3 semaines afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

(380,40g) de poudre d'écorce grossièrement broyées dans un moulin électrique ont été pesées.

II.1.4.1 Extraction à chaud par les solvants organiques à polarité croissante

Consiste à une extraction par épuisement successif de la poudre d'écorce à l'aide de solvants de polarité croissante tout en utilisant le dispositif de Soxhlet. Pour ce faire, les solvants suivant ont été utilisés ; l'éther de pétrole, le chloroforme, le chloroforme- Méthanol (9 :1 ; v/v) et le Méthanol.

La matière végétale (380,40g), est introduite dans du papier Wattman préparé sous forme de cartouche placée dans l'appareil de Soxhlet. Ce dispositif est surmonté d'un réfrigérant et porté par un ballon contenant le solvant d'extraction (1500 ml). Une série de plusieurs siphonages a permis l'extraction jusqu'à épuisement de la poudre par chacun des solvants utilisés.

Par la suite, les extraits ont été filtrées à travers un papier filtre, et les filtrats ont été évaporé sous vide à 40°C, dans un évaporateur rotatif (BUCHI Rotavapor® R-215).

Le marc a été séché à sec sous la haute pendant 2 jours, puis conservé dans une boîte en verre hermétiquement fermée et envelopper de papier aluminium afin qu'il soit à l'abri de la lumière pour une utilisation ultérieur. Les extraits secs ont été conservés, à 4°C (**Abdel Moneim, 2011**).

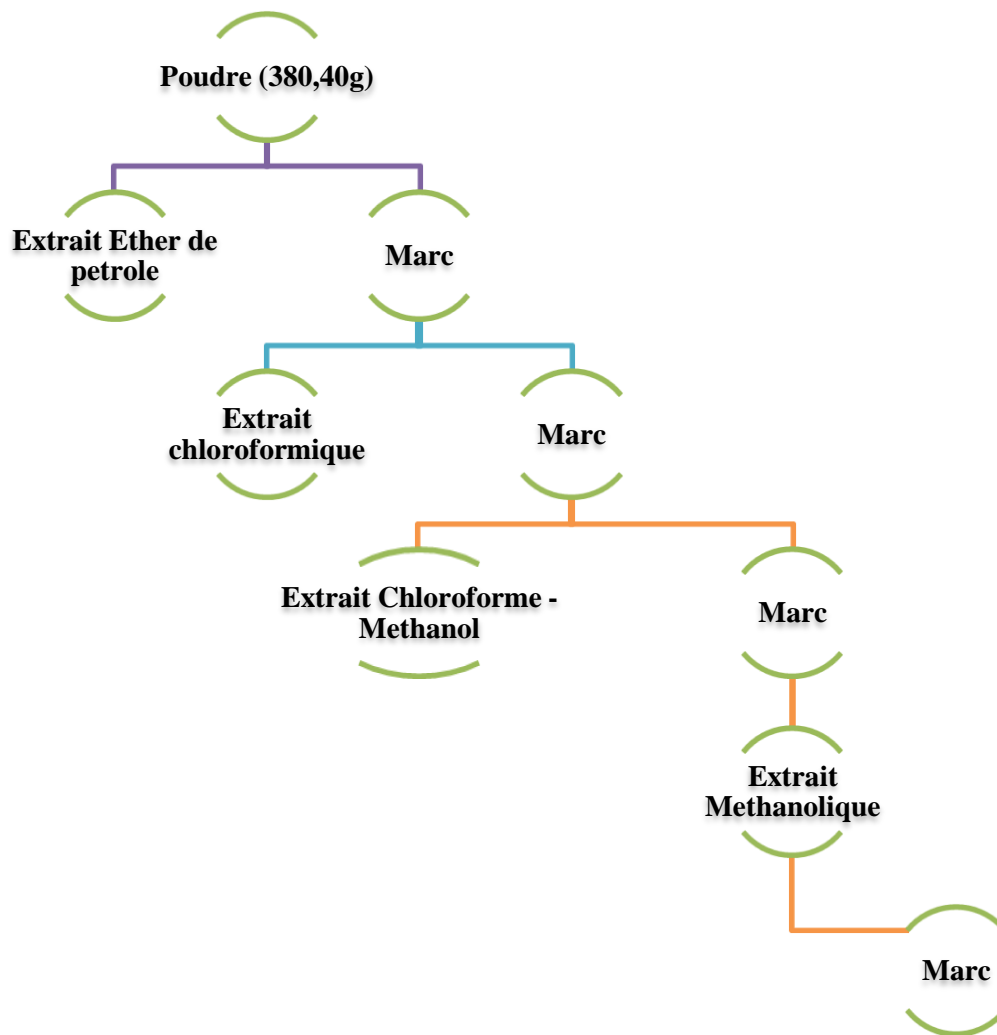


Figure 08 : Schéma d'extraction par les solvants organiques de la poudre d'écorces de *Punica granatum* L.

II.1.4.2. Préparation de l'extrait aqueux

Nous avons procédé à une décoction aqueuse pour l'obtention de l'extrait aqueux suivant le protocole de **Kadi et al. (2011)** ; **Kanoun et al. (2014)**. Cinquante grammes (50 g) de matière sèche (Marc) ont été mis en décoction dans un ballon contenant 500 ml d'eau distillée

La décoction a été maintenue sous reflux continu pendant 06 heures. Au terme de cette opération, le décocté obtenu après refroidissement a été filtré avec du papier Whatman n°1.

Le filtrat a été conservé dans des bouteilles de stockage ambrées à - 4°C pour être lyophiliser.

II.1.4.2.1. Lyophilisation de l'extrait aqueux

La réalisation de cette étape a été effectuée au niveau du laboratoire de recherche de *Conservation et Valorisation des Ressources Marines* (CVRM) de l'Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et aménagement du littoral (ENSSMAL), *sise* à Sidi Frej.

La lyophilisation est une technique permettant la déshydratation de l'échantillon congelé par sublimation à basse température (-55°C) et sous vide (0,1 bar) pendant 48 heures. Au bout de 24 h les échantillons sont retirés du lyophilisateur pour être remués à l'aide d'une spatule en acier inoxydable afin de permettre leur déshydratation complète.

II.1.5. Analyse qualitative

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie analytique du *Centre de Recherche et de Développement (CRD)*- Groupe SAIDAL, El-Mouhamadia-Alger.

Nous avons caractérisé les différents groupes chimiques en nous référant aux techniques décrites par plusieurs auteurs (**Harborne, 1998; Kokate, 2005; Roopalatha et Nair, 2013**):

II.1.5.1. Préparation des solutions mères

Pour chaque extrait une solution est préparée à une concentration de 1% (P/V) en utilisant l'éther de pétrole (EEP), le chloroforme (EC), le chloroforme-Méthanol (9 :1 V/V) (ECM), le Méthanol (EM) et l'eau distillée (EA) respectivement (**Roopalatha et Nair, 2013**).

II.1.5.2. Caractérisation des principaux constituants chimiques

a) Tanins

- Test du chlorure ferrique

0,5g de chaque extrait sec est dissous dans 10 ml d'eau distillée bouillante. La solution est filtrée. A 1ml du filtrat, quelques gouttes d'une solution de Fe Cl₃ à 6% sont rajoutées.

La réaction donne une coloration bleu-noir en présence des tanins (**Qnais et al., 2007 in Hajoori et al., 2014**).

- Test de gélatine salée

Quatre à cinq gouttes de gélatine salée (gélatine aqueuse à 1% mélangée à une solution de chlorure de sodium à 10%) sont versées dans 1 ml d'extrait. La formation d'un précipité blanc indique la présence de tanins condensés de type pyrogallique (**Roopalatha et Nair, 2013**).

b) Alcaloïdes

- Test de Dragendorff

0,5g d'extrait sec sont dissout dans 5ml d'une solution d'HCl à 1%, le mélange est maintenu dans un bain-marie pendant 2min. La solution est filtrée (**Wagner et Blatt, 1996 in Hajoori et al., 2014**).

Dans un tube, quatre à cinq gouttes de réactif de Dragendorff sont ajoutées à 1ml du filtrat. L'apparition d'une précipitation ou d'une floculation dans l'extrait après addition du réactif indique la présence des alcaloïdes.

c) Flavonoïdes

- Test d'acétate de plomb

Quelques gouttes d'une solution de 10% d'acétate de plomb ajoutées à 1 ml de la solution d'essai ont donné lieu à la formation d'un précipité jaune confirmant la présence des flavonoïdes (**Bhandary et al., 2012**).

d) Phytostérols

- Test de Libermann-Burchard

La méthode Libermann-Burchard a été utilisée comme décrit par **Roopalatha et Nair (2013)** avec certaines modifications. 1 ml de la solution de chaque extrait est additionné d'1 ml de solution d'anhydride acétique. Après une légère agitation, le mélange est chauffé jusqu'à ébullition. Une fois refroidit, 1 ml d' H_2SO_4 concentré est ajouté le long de la paroi du tube incliné.

Après une heure, l'apparition d'un anneau brun-rouge à la jonction, alors que le virage au vert foncé de la phase supérieure (phase aqueuse), traduit la présence des phytostérols dans l'extrait à tester.

e) Stéroïdes et tritérpénoïdes

- Test de Salkowski

(2 mg) d'extrait sec a été dissout avec 1 ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés le long du côté du tube à essai. Une couleur brun rougeâtre formée à l'interface indique que le test est positif pour tritérpénoïdes et les stéroïdes (**Agarwal et al., 2011 in Hajoori et al., 2014**) .

f) Carbohydrates

- Test de Fehling

Dissoudre 2 mg d'extrait sec dans 1 ml d'eau distillée et 1 ml supplémentaire de (solution A + B) du réactif de Fehling. Le mélange est agité puis chauffé dans un bain-marie pendant 10 minutes. Le précipité rouge brique formé confirme le test (**Roopalatha et Nair, 2013**).

- Test de Molish

A 1 ml de solution d'essai sont ajoutées quelques gouttes de 1% d'alpha-naphtol et 2-3 ml d'acide sulfurique concentré le long du côté du tube à essai. La formation d'un anneau violet rougeâtre ou violet à la jonction de deux liquides confirme le test (**Roopalatha et Nair, 2013**).

g) Glycosides cardiotoniques

- Test de Keller –Killiani

0,4 ml d'acide acétique glacial et quelques gouttes de solution de chlorure ferrique à 5% sont ajoutés à un peu d'extrait sec. Auxquels, 0,5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés le long du tube à essai avec soin.

Un anneau brun obtenu à l'interphase indique la présence des désoxy-sucres. Tandis que, la formation d'une couleur bleu dans la couche d'acide acétique confirme le test (**Bhandary et al., 2012 in Hajoori et al., 2014 ; Roopalatha et Nair, 2013**)

h) Glycosides d'antraquinones

- Test d'hydroxyanthraquinone

A 1 ml de l'extrait, ajouter quelques gouttes de solution d'hydroxyde de potassium à 10%. La formation de couleur rouge confirme le test (**Roopalatha et Nair, 2013**).

i) Acides aminés

- *Test à la ninhydrine*

Afin de détecter les acides aminés libres, 1ml de solution de ninhydrine de 0,2% est ajouté à 1ml de la solution d'extrait et mis à ébullition. La formation de couleur pourpre indique un résultat positif (**Bhandary et al., 2012 in Hajoori et al.,2014**).

j) Protéines

- **Test de Biuret**

A 2 ml de la solution d'essai, cinq gouttes de solution de sulfate de cuivre à 1% et 2 ml de NaOH à 10% sont ajoutés. Après agitation, l'apparition d'une couleur pourpre ou violette confirme la présence des protéines (**Roopalatha et Nair, 2013**).

k) Saponines

5 ml de la solution d'extrait pris dans un tube à essai a été bien agité pendant cinq minutes. La formation de mousse stable après 15min confirme le test (**Bhandary et al., 2012 in Hajoori et al., 2014 ; Nair et al., 2013**).

l) Lipides et huiles fixes

A 1 ml de la solution d'échantillon, 1 ml de solution de sulfate de cuivre à 1% et quelques gouttes d'hydroxyde de sodium à 10% sont ajoutés. La formation d'une solution bleu clair confirme le test (**Roopalatha et Nair, 2013**).

II.1.6. Analyse quantitative

II..1. 6.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques (TCP) des différents extraits obtenus à partir du fruit de *Punica granatum* a été déterminée au moyen du réactif de Folin-ciocalteu suivant la méthode de **Singleton et Rossi (1965) in Hmid, 2013**.

Les extraits secs d'écorce à savoir l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux ainsi que le jus de grenadier ont été dilués dans un mélange méthanol –eau (6 :4 v /v).

300 µl de chaque extrait ou dilution, est mise dans un tube à essai en présence de 1.5 ml du réactif de Folin-ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué). Après agitation vigoureuse et un repos de 8 min à 22°C, 1.2 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7.5% sont ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre ([PerkinElmer Lambda 25 UV/Vis](#)) à 760 nm.

Un blanc est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait par le mélange méthanol –eau (6 :4 v /v). Les solutions des différents échantillons à doser et la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions.

Les polyphénols totaux sont quantifiés en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme $y = a x + b$ réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence (20-200µg/ml). Les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique (EAG) (mg EAG/g d'extrait sec) et en (EAG mg /L de jus).

II.1.6.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes totaux (TF) des extraits a été mesurée par spectrophotométrie suivant la méthode de **Quettier-Deleu et al. (2000) in Orak et al. (2012)**. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïdes-aluminium, ayant une absorption maximale à 430nm.

A 1ml de chaque échantillon (préparé dans le méthanol) est ajouté à 1ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2%. Après incubation à température ambiante pendant 15min, l'absorbance est lue à 430nm.

Une courbe d'étalonnage ($y = a x + b$) est établie séparément par la quercétine (2.5- 40µg/ml) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait.

Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine (EQ) par gramme d'extrait sec (mg EQ/g) et en milligramme par cent millilitre de jus (mg EQ/100ml).

II.1.6.3. Détermination de la teneur des tannins hydrolysables

La teneur en tanins hydrolysables est déterminée par la méthode de **Willis et Allen (1998)** modifié par **Hmid (2013)**.

Une mixture d'un millilitre de chaque extrait de *Punica granatum* (préparé dans de l'eau distillée) et de 5 ml d'une solution aqueuse de KIO_3 à 2.5% sont mélangés à l'aide d'un vortex pendant dix secondes.

L'absorbance est obtenue après 4 min d'incubation à une température ambiante, et elle est mesurée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (PerkinElmer Lambda 25 UV/Vis).

Une gamme de 6 concentrations d'acide tannique (AT) allant de 0.5 à 2 mg/ml a été préparée à partir d'une solution mère à 2 mg/ml dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par litre de jus et en mg par gramme d'extrait sec.

II.1.6.4 Détermination de la teneur en tannins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode de la vanilline décrite par **Hagerman (2002)**.

Dans un erlenmeyer, 1 ml de l'échantillon (préparé dans le méthanol) est ajouté à 5ml du réactif d'analyse (2,5 ml de la solution de vanilline à 1% mélangée à 2,5 ml de la solution du HCl à 8% (8 ml HCl complétés à 100 ml avec du méthanol)), le mélange est vigoureusement agité. Après 1 min ; 5ml de la solution HCl à 4% sont additionnée. L'erlenmeyer est ensuite introduit au bain marie à 30°C et laissés pendant 20 min.

La lecture des absorbances est lue à 500 nm en respectant l'intervalle d'une minute.

Une courbe d'étalonnage établie par la catéchine servira à la quantification des tanins condensés.

La teneur en tanins condensés est exprimée en milligramme d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g) et par L de jus frais (mg EC/ L).

II.1.6.5. Détermination de la teneur en anthocyanes totaux

La composition en anthocyanine totaux (AT) est estimée par la méthode du pH différentielle en utilisant deux tampons : tampon chlorure de potassium à pH 1.0 (0.025 M) et le tampon acétate de sodium à pH 4.5 (0.4M) (**Ozgen et al., 2008**).

0.4 ml de chaque extrait est mélangé séparément avec 3.6 ml de chacun des deux tampons, mesurer à 510nm et 700nm contre un blanc (eau distillée), ensuite l'absorbance (Abs) est calculée comme suit :

$$Abs = (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH_{1,0}} - (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH_{4,5}}$$

Les anthocyanes totaux des échantillons, exprimés en milligramme d'équivalent cyanidine-3-glycoside par L de Jus frais (mg ECG/ L) et par g d'extrait sec (EM, EA), sont calculées par l'application de la formule suivante :

$$Composition\ en\ anthocyanes\ totaux = \frac{Abs \times PM \times FD \times 100}{CAM}$$

- **Abs** : absorbance ;
- **PM** : Poids moléculaire de la cyanidine-3-glycoside (449.2 g/mol) ;
- **FD** : Facteur de dilution (10) ;
- **CAM** : Coefficient d'absorption molaire de Cyanidine-3-glucoside (26.900).

II.1.6.6. Détermination du contenu en proanthocyanidines

La méthode de dosage des proanthocyanidines est réalisée suivant la procédure rapportée par **Li et al. (2006) ; Wang et al. (2011)**.

Une quantité de 0.05 g d'extraits séchés sont dissous dans 5 ml de méthanol, ou les filtrats composés de 50 ml sont utilisés directement. Un volume de 1 ml de solution est mélangé avec 3 ml d'une solution de vanilline-méthanol à 4% et 1.5 ml d'acide chlorhydrique. Le mélange est laissé au repos pendant 15 min à température ambiante.

L'absorbance à 500 nm a été mesurée et une courbe d'étalonnage ($y = a x + b$) est établie séparément par la catéchine (0 – 0.08 mg/ml) pour calculer la concentration des proanthocyanidines dans chaque extrait.

Les résultats sont exprimés en équivalents catéchine (EC, mg /g de masse sèche) et en (EC mg/L de JPG).

II.1.7. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante des extraits de *Punica granatum*

II.1.7.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

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

Cette capacité de céder les hydrogènes est mise en évidence par une méthode spectrométrique en suivant la disparition de la couleur violette de la solution contenant le DPPH. Le pouvoir antioxydant sera comparé par la suite avec des antioxydants de synthèse à savoir hydroxytoluène butylé (BHT), hydroxyanisole butylé (BHA), acide ascorbique (Vit C) et α -tocophérol (Vit E).

L'activité antioxydante du jus brut et des extraits de *Punica granatum* a été évaluée en utilisant la méthode de **Cuendet et al. (1997)** ; **Burits et Bucar (2000)**.

▪ Préparation de la solution mère de DPPH

Le DPPH est solubilisé dans l'éthanol à raison de 4mg / 100ml, sous agitation magnétique pendant une demi heure et à l'abri de la lumière.

▪ Préparation de la solution mère et les dilutions des extraits

Comme première étape, nous avons préparé une solution mère à une concentration 0.5mg/ml en faisant dissoudre 2.5 mg de notre extrait dans 5ml de méthanol. Pour la réalisation des différents tests, nous avons préparés cinq dilutions à partir de la solution mère, dosées à : 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.015 mg/ml, 0.008 mg/ml.

Dans des tubes secs, 1 ml de méthanol est rajouté, 1 ml de la solution mère (0.5mg/ml) est rajouté au premier tube après agitation au vortex, 1 ml de cette solution est prélevé et rajouté au second tube constituant ainsi les différentes dilutions. Où chacune des dilutions est mélangée à 2 ml de la solution méthanolique de DPPH.

Après une période d'incubation de 30min à température du laboratoire et à l'obscurité ainsi qu'à l'abri de l'O₂ atmosphérique.

En parallèle, des solutions méthanolique d'antioxydants de synthèse (BHA) et l'acide ascorbique ont été préparées dans les mêmes conditions.

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

Le contrôle négatif contient uniquement la solution méthanolique de DPPH.

Les résultats obtenus sont exprimés par rapport à ceux obtenus pour les antioxydants de références. Le pourcentage d'inhibition (% I) du radical DPPH par les extraits méthanoliques, aqueux et le jus de fruit de *Punica granatum* est calculé comme suit :

$$\% \text{ DPPH} = \frac{\text{Abs T} - \text{Abso E}}{\text{Abs T}} \times 100$$

Où :

- **% DPPH** : Taux du DPPH piégé ou taux d'inhibitions.
- **Abs T** : Absorbance du témoin (solution de DPPH –blanc) en (nm).
- **Abs E** : Absorbance de l'échantillon.

▪ **Calcul des concentrations inhibitrices (IC₅₀)**

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50% qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH'.

II.1.7.2. Méthode de réduction du Fer: FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Zhao et al. (2007) in Ali et al. (2014)**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fer (III) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe (II). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

1ml de chaque extrait à différentes concentrations est mélangé avec une solution tampon phosphate (2.5ml, 200mM, pH 6.6) et 2.5ml d'une solution de ferricyanure de potassium

$K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20min, puis refroidi à une température ambiante. 2.5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un aliquote 2.5ml de surnageant est ajouté à 2.5 ml d'eau ultrapure et 500 μ l d'une solution aqueuse de chlorure de Fer ($FeCl_3, 6H_2O$) à 0.1% sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique aux mêmes concentrations et dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

II.1.7.3. Méthode de décoloration du β -carotène

Cette méthode consiste à mesurer la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C). L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène (**Laguerre et al., 2007 in El-Haci, 2015**).

La capacité des extraits à inhiber la décoloration du β -carotène a été déterminée selon **Ozsoy et al. (2008)**, 2mg de β -carotène sont dissouts dans 10ml de chloroforme, puis 1ml de cette solution est mélangé avec 20mg d'acide linoléique purifié et 200mg de Tween 40. Ensuite, le chloroforme est évaporé sous pression réduite par évaporateur rotatif à 40°C et le résidu obtenu est repris par 50ml d'eau ultra pure oxygénée.

Des tubes contenant 5ml de cette émulsion sont préparés, pour lesquels, 200 μ l d'échantillons ou d'antioxydants de référence (BHA) à différentes concentrations sont ajoutés.

Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470nm se fait immédiatement à t_0 contre un blanc qui contient l'émulsion sans la β -carotène. Les tubes couverts sont incubés à 50°C et la lecture de l'absorbance est effectuée après 120min.

Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5ml de l'émulsion du β -carotène et 200 μ l d'éthanol.

Les résultats obtenus sont exprimés en termes de pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (A_0 - A_t / A_0^0 - A_t^0)] * 100$$

- A_0 : Absorbance de l'échantillon à t_0
- A_t : Absorbance de l'échantillon après incubation de 120min.
- A_0^0 : Absorbance du contrôle négatif à t_0
- A_t^0 : Absorbance de l'échantillon après incubation de 120min.

II.1.8. Etude statistique

Tous les échantillons ont été analysés en triple. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Statistica version 6.1 (StatSoft, Inc. USA, 2003). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

II.1.9. Résultats de l'étude phytochimique

II.1.9.1. Caractéristiques pomologiques

Les caractéristiques pomologiques du cultivar de grenadier étudié (Doux de Messaad), sont présentées dans le tableau 03:

Tableau 03 : Caractéristiques pomologiques du grenadier cultivar Doux de Messaad.

Cultivar	Poids moyens des fruits (g)	Poids moyens des arilles (pulpe) (g)	Poids moyens de l'écorce (g)
Doux de Messaad	264.90 ± 86.33	154.10 ± 58.40	109.43 ± 45.53

Nous constatons que le poids moyen des grenades du cultivar « Doux de Messaad » (DM) était de 264.90g (**Tableau 03**), ceci les classent comme de moyenne taille selon les critères utilisés par **Martinez et al. (2006)**, pour les cultivars espagnols. Notons également que le poids moyen en arilles et en écorces est de 154.10 g et 109.43g, respectivement.

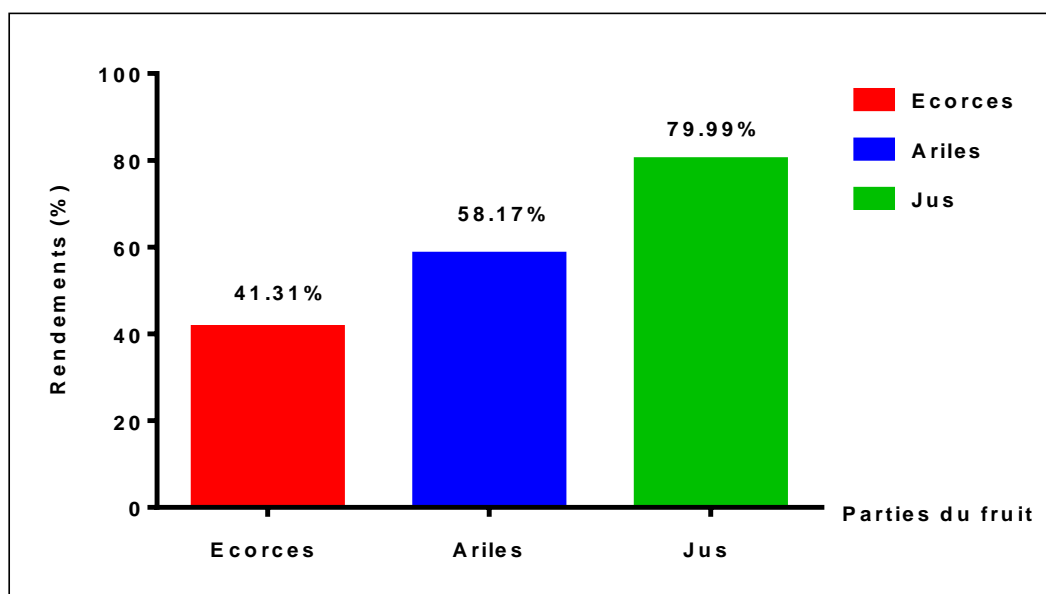


Figure 09 : Rendement en arilles, écorces et en jus

Par ailleurs, la partie comestible du fruit de *Punica granatum* représente 58.17 % du poids total, avec 79.99 % de jus. Alors que la partie non comestible représente 41.31 % du poids des fruits (**Figure 09**).

II.1.9.2. Taux de solides solubles, de l'acidité titrable, pH et l'indice de maturité

Les résultats sont illustrés dans le tableau 04 :

Tableau 04 : Caractéristique chimique du jus de *P. granatum var.* Doux de Messaad

	Acidité titrable (g d'EAC/ 100ml)	Taux de solides solubles TSS (°Brix)	pH	Indice de maturité (IM)
Jus var. Doux de Messaad	0.47 ± 0.08	27.50 ± 3.04	4.12 ± 0.02	58.95 ± 8.52

Les résultats obtenus montrent que la variété de grenadier étudiée « Doux de Messaad » présente un taux de solubles solides important de l'ordre de 27.50 °Brix et une acidité titrable minimale (0.47%). Le pH est de 4.12 ce qui est confirmé par le goût acide des fruits.

Dans le classement actuel des cultivars espagnols établis par **Melgarejo (1993, 1998)**, nous trouvons: cultivars doux (MI = 31-98), cultivars aigre-doux (MI = 17-24) et cultivars aigres (MI = 5-7). L'indice de maturité (TSS / TA) du cultivar évalué présenté dans le tableau montre que le cultivar Doux de Messaad appartient à la première catégorie.

II.1.9.3. Rendement des extractions

Les écorces de grenade de la variété Doux de Messaad ont été soumis à une extraction en utilisant différents solvants à polarité croissante, de l'éther de pétrole, du chloroforme seul ou en combinaison avec du méthanol, du méthanol et de l'eau. Les résultats des rendements d'extraction sont présentés dans la figure ci-dessus.

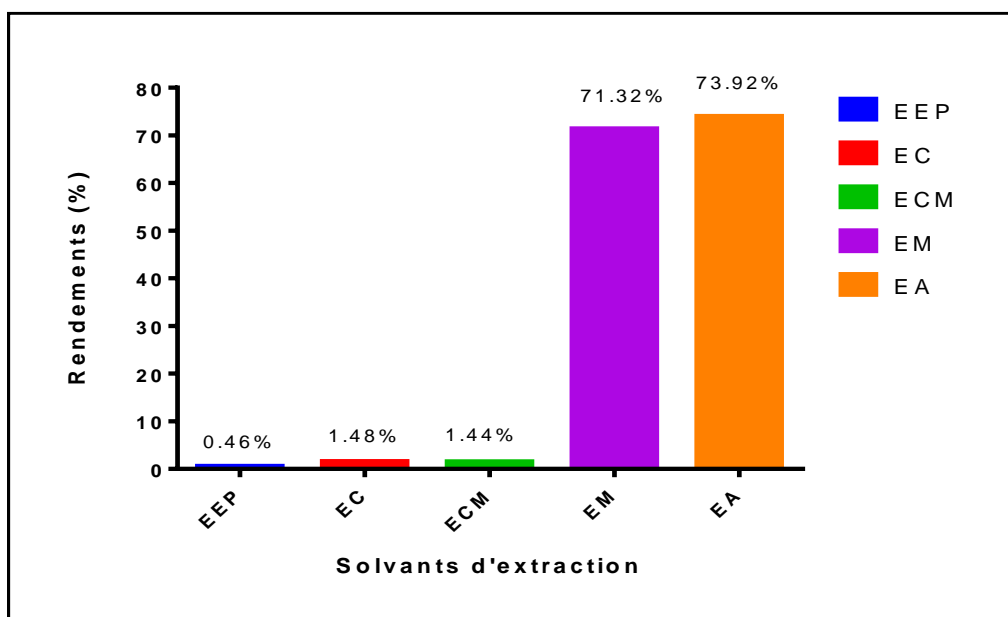


Figure 10 : Rendements des extractions (en %) en utilisant différents solvants.

EEP : extrait éther de pétrole ; **EC :** extrait de chloroforme ; **ECM :** extrait de chloroforme-méthanol ; **EM :** extrait méthanolique ; **EA :** extrait aqueux

Comme l'indique la figure 10, le pourcentage de rendement différait entre les extraits en fonction du solvant d'extraction. L'eau et le méthanol ont produit les extraits les plus concentrés avec les rendements les plus élevés (73.92 et 71.32 %, respectivement). Suivi de loin par le chloroforme (1.48), le chloroforme- méthanol (1.44) et l'éther de pétrole (0.46), donnant ainsi les moindres rendements. Cela peut s'expliquer par le fait que se sont des solvants organiques très volatils et utilisés juste pour dégraisser les drogues.

II.1.9.4. Analyse qualitative (Screening phytochimique)

Les phytoinvestigations de base des extraits pour leurs principaux constituants (phytocomposés) sont vitales car les principes actifs de nombreux médicaments sont ces métabolites secondaires trouvés dans les plantes.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques effectués sur les différents extraits sont indiqués dans le tableau 05.

Tableau 05 : Résultat du screening phytochimique du jus et des extraits de *Punica granatum*

EEP : extrait éther de pétrole ; **EC** : extrait de chloroforme ; **ECM** : extrait de chloroforme-méthanol ; **EM** : extrait méthanolique ; **EA** : extrait aqueux ; **JPG** : Jus de *Punica granatum*

Composés	Tests phytochimiques	EEP	EC	ECM	EM	EA	JPG
Alcaloïdes	Test de Dragendorff	-	+	+++	+++	+	+++
Flavonoïdes	Test d'acétate de plomb	-	+	+++	+++	++	+++
Tanins	Test de gélatine	-	-	-	+++	-	+++
	Test de Chlorure de fer	-	++	+++	+++	+++	+++
Stéroïdes et tritérpénoïdes	Test de Salkowski	+	+++	+++	+++	+++	+++
Saponines	Indice de mousse	+	+++	+++	++	+++	+
Glycosides cardiotoniques	Test de Keller-Killiani	-	+	++	++	-	+
Glycosides anthraquinones		-	-	+	+	+	+
Carbohydrates	Test de Fehling	-	++	+++	+	+	++
	Test de Molish	-	+	+++	++	++	+++
Phytostéroles	Test de Libermann-Burchard	++ +	++	-	-	-	-
Protéines	Test de Biuret	-	-	-	-	-	-
Acides aminés	Test de ninhydrine	-	-	-	-	-	+++
Lipides et huiles fixes		-	-	-	-	-	-

Les résultats sont classés comme suit ; Elevé (+++), Modéré (++) , bas (+) et nul (-) sur la base de l'intensité du produit de réaction coloré.

Le test de Dragendorff pour les alcaloïdes était positif dans tous les extraits ; présence d'une quantité élevée dans l'extrait de chloroforme-méthanol et l'extrait méthanolique alors que dans les extraits de chloroforme et aqueux une faible présence est notée.

Pour ce qui est des deux tests à savoir ; le test de Salkowski pour les stéroïdes & triterpénoïdes et l'indice de mousse pour la caractérisation des saponines ; ces derniers se sont révélés positifs dans tous les extraits.

Le test de Libermann-Burchard pour les phytostérols était positif dans les extraits d'éther de pétrole et de chloroforme. Toutefois, il était négatif dans le reste des extraits (ECM, EM, EA et JPG).

Le test d'acétate de plomb a indiqué la présence d'une grande quantité de flavonoïdes dans les extraits ECM, EM et JPG tandis que l'extrait aqueux et de chloroforme ont présenté une quantité modérée et faible en flavonoïdes, respectivement.

Le test de Keller-Killani pour les glycosides cardiotoniques a été négatif dans les extraits d'éther de pétrole et aqueux. Positif dans le reste des extraits (EC, ECM, EM et JPG).

Le test des glycosides anthroquinones était positif dans les extraits de chloroforme-méthanol, méthanolique, aqueux et le jus brut seulement. Les tests de Molisch et de Fehling ont indiqué la présence d'une quantité élevée de carbohydrates dans tous les extraits mis à part l'extrait d'éther de pétrole.

En outre, le test de ninhydrine pour les acides aminés était positif uniquement dans le JPG. Quant aux tests de protéines (Biuret) et des graisses et des huiles fixes, ont été négatifs dans tous les extraits.

En conclusion, l'étude phytochimique révèle que les différents extraits de l'épicarpe (chloroforme-méthanol, méthanolique, aqueux) et le jus brut de *Punica granatum* sont les plus riches en métabolites secondaires, notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les glycosides, les carbohydrates et les saponines. La présence de ces différents phytoconstituants peut être responsable des propriétés thérapeutiques de la grenade.

II.1.9.5. Analyse quantitative

Les courbes d'étalonnages des dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des tanins hydrolysables & condensés et des proanthocyanidines sont énumérées en **Annexe I**.

II.1.9.5.1. Teneur en polyphénols totaux

Les résultats sont rassemblés dans le **tableau 06** afin de faire une comparaison entre la composition polyphénolique de l'épicarpe et du jus. Le tableau représente les teneurs en Polyphénols totaux (PPT) exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g) et en (mg EAG/l) de la matière fraîche, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique ($y = 0.0101 - 0.0288x$, $r^2 = 0.9911$) (**Figure 50, annexe I**).

Tableau 06 : Teneurs en polyphénols totaux des trois extraits

Extraits	Polyphénols totaux
Extrait méthanolique (EM)	227.92 ± 0.50 mg EAG/g
Extrait aqueux (EA)	92.60 ± 0.38 mg EAG/g
Jus de fruit (JPG)	1600.46 ± 2.29 mg EAG/l

A partir des résultats obtenus, nous avons observé des teneurs variées en polyphénols dans les différents extraits de fruit de *P. granatum*.

La teneur en polyphénols la plus importante a été enregistré pour l'extrait méthanolique avec une valeur de l'ordre de 227.92±0.50 mg EAG/g alors que le contenu était minimum pour l'extrait aqueux (92.60±0.38 mg EAG /g). Tandis que, le jus frais du fruit de *Punica granatum* (JPG) renferme une teneur en polyphénols totaux de 1600.46 ± 2.29mg EAG/L.

II.1.9.5.2. Teneur en flavonoïdes totaux

Le tableau 07 illustre les teneurs des extraits d'écorces et du jus en flavonoïdes (exprimées en mg d'équivalent quercétine par g d'écorce et par L de jus).

Tableau 07 : Teneurs en flavonoïdes totaux des trois extraits

Extraits	Flavonoïdes totaux
Extrait méthanolique (EM)	31.34 ± 0.26 mg EQ/g
Extrait aqueux (EA)	21.67 ± 0.09 mg EQ/g
Jus de fruit (JPG)	204.05 ± 0.32 mg EQ/L

Comme le montre le tableau 07, une légère différence dans la teneur en flavonoïdes est observée entre les extraits d'écorces étudiés ; Elle varie entre 31.34 mg EQ/g pour l'extrait méthanolique et 21.67 mg EQ/g pour l'extrait aqueux.

Toutefois, la teneur en flavonoïdes de notre échantillon de jus de grenade de la variété Messaad est de l'ordre de 204.05 mg EQ/L.

II.1.9.5.3. Teneur en tanins hydrolysables et condensés

Les résultats obtenus pour les tanins hydrolysables et condensés sont présentés dans le tableau 08 :

Tableau 08: Teneurs en tanins hydrolysables et en tanins condensés des trois extraits

Extraits	Teneur en tanins hydrolysables (mg EAT/g) et (mg EAT/l)	Teneurs en tanins condensés (mg EC/g) et (mg EC/l)
Extrait méthanolique (EM)	214.28 ± 1.79	47.78 ± 3.27
Extrait aqueux (EA)	103. 50± 0.39	33.67 ± 0.86
Jus de fruit (JPG)	993.57 ± 3.38	317.02 ± 0.56

Les résultats de l'analyse quantitative par spectrophotomètre UV-visible montre que le jus brut (JPG) et les extraits d'écorces (extrait méthanolique et aqueux) de fruit de *Punica granatum* étudiée, sont riches en tanins hydrolysables. Cette teneur varie de 993.57 ± 3.38 mg EAT/l de jus ; 214.28 ± 1.79 à 103. 50± 0.39 mg EAT/ g pour l'extrait méthanolique et aqueux, respectivement.

Nous constatons également que le jus brut renferme une teneur élevée en tanins condensés (317.02 ± 0.56 mg EC/L). Alors que pour les extraits méthanoliques et aqueux, elle varie respectivement, de 47.78 ± 3.27 à 33.67 ± 0.86 mg EC/g d'extrait.

II.1.9.5.4. Teneur en proanthocyanidines

Les teneurs totales en proanthocyanidines des extraits méthanoliques (EM), aqueux (EA) et du jus frais de *Punica granatum* (JPG) sont représentées dans le tableau 09 suivant :

Tableau 09 : Teneurs en proanthocyanidines des trois extraits

Extraits	Proanthocyanidines
Extrait méthanolique (EM)	24.24 ± 0.23 (mg EC/g)
Extrait aqueux (EA)	4.65 ± 0.07 (mg EC/g)
Jus de fruit (JPG)	133.45 ± 1.17 (mg EC/l)

L'estimation quantitative de la teneur totale en proanthocyanidines des extraits méthanoliques et aqueux du cultivar de grenadier « Doux de Messaad » testé (Tableau 09), montre que l'extrait méthanolique contient le pourcentage le plus élevé de proanthocyanidines comparé à l'extrait aqueux (24.24 et 4.65 mg EC/g, respectivement). Alors que pour le jus de fruit (JPG), nous enregistrons une teneur de 133.45 ± 1.17 mg EC/l.

II.1.9.5.5. Teneur en anthocyanines

Les teneurs des extraits EM, EA et du jus en anthocyanines exprimées en mg d'équivalent cyanidine-3-glucoside par g d'extrait sec et par L de jus, sont rapportées dans le tableau 10 :

Tableau 10 : Teneurs en anthocyanines des trois extraits

Extraits	Anthocyanines (mg ECG/g) et (mg ECG/l)
Extrait méthanolique (EM)	14.41 ± 0.42
Extrait aqueux (EA)	16.75 ± 0.34
Jus de fruit (JPG)	1586.39 ± 44.18

La teneur en anthocyanines la plus élevée a été déterminée dans le jus de fruit 1586.39mg dans 1 litre de jus. Alors que le contenu en anthocyanes pour les extraits d'écorces de fruit à savoir l'extrait aqueux (EA) et l'extrait méthanolique (EM) est plus en moins faible. Toutefois, il reste presque similaire et varie de 16.75 ± 0.34 (EA) et 14.41 ± 0.42 mg ECG/g (EM).

II.1.9.6. Activité antioxydante des extraits d'écorces et du jus de fruit de *P. granatum*

II.1.9.6.1. Piégeage du radical libre DPPH'

La figure 11 illustre l'efficacité des extraits de *Punica granatum* (EM, EA, JPG) à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

D'après les résultats, l'évolution de l'activité anti-radicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel. Les **tableaux 14 et 15 (Annexe I)** montrent bien cela.

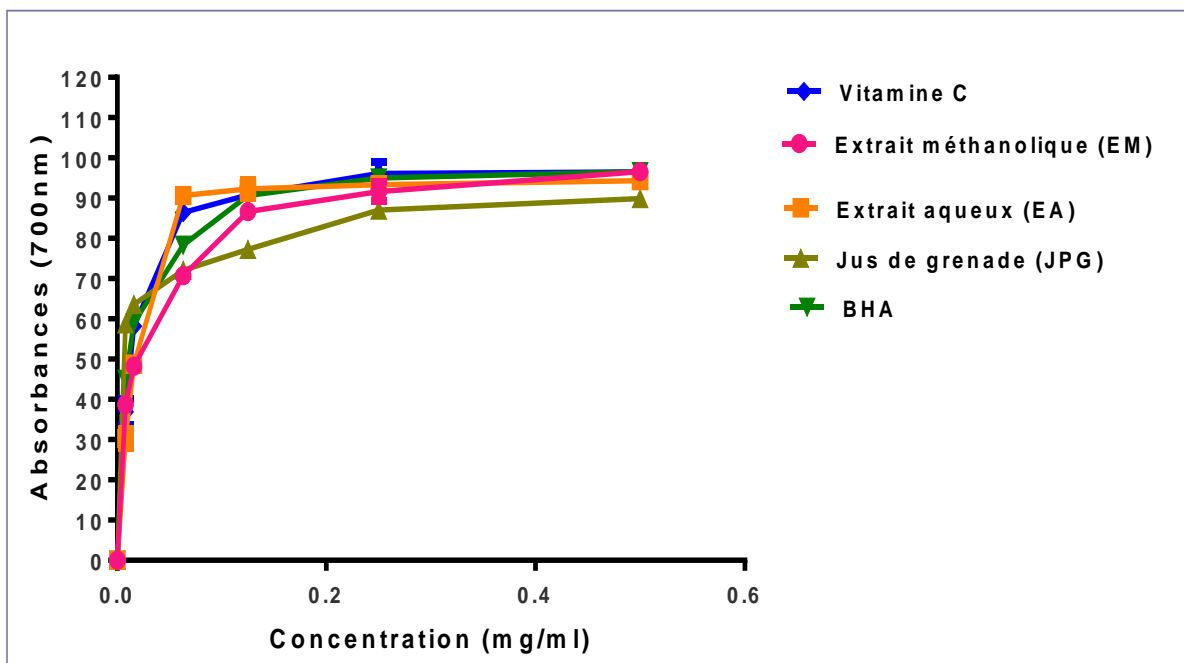


Figure 11 : Pouvoir antioxydant des extraits organiques et du jus de fruit de *Punica granatum* par la méthode du piégeage du radical libre DPPH'

Il ressort de ces résultats que le pouvoir de piégeage du radical DPPH est dépendant de la concentration. Le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement total du DPPH présent dans le milieu.

Dans ce présent travail, nous avons comparé l'activité antioxydante des extraits de grenadier à celle des antioxydants de référence synthétique à savoir ; l'hydroxyanisole butylé (*BHA*), le et l'acide ascorbique (Vitamine C).

D'après la figure 11, nous remarquons que les différents extraits organiques (EM et EA) ont montré une activité antioxydante très importante vis-à-vis du piégeage du radical DPPH. Sauf pour le jus brut qui a exercé un pouvoir antioxydant plus au moins important. Nous constatons également que pour les extraits organiques (méthanolique et aqueux), des pourcentages d'inhibition importants ont été atteints avec présence d'une phase stationnaire (saturation). Les pourcentages d'inhibition trouvés étaient de l'ordre de 90.60 % pour l'extrait aqueux, à une concentration de 0.063 mg/ml alors qu'il était de 70.71 % pour l'extrait méthanolique. De même, le jus brut ne dépassait pas les 72 % d'activité à la même concentration.

Par contre, le pourcentage d'inhibition du jus brut de *Punica granatum* à des concentrations minimales (0.008 et 0.016mg/ml) variait de 58.76 à 63.59% dépassant ainsi les 50% d'activité ; contrairement aux extraits organiques : 38.65 à 48.22 % pour l'extrait méthanolique et de 30.26 à 48.77 % pour l'extrait aqueux.

Quand aux contrôles positifs utilisés, nous avons remarqué un fort pouvoir antioxydant traduit par des pourcentages d'inhibition élevés et ce même à de très faibles concentrations.

A 0.008 mg/ml, le pourcentage d'inhibition du BHA vis-à-vis du radical DPPH est de l'ordre de 44.98% comparativement à celui de la vitamine C (36.89%). Toutefois, ils sont nettement inférieurs au pourcentage d'inhibition du jus de grenade qui est de l'ordre de 58.76%

Pour faire une étude comparative de l'activité de tous les composés, nous avons déterminé la valeur de la concentration inhibitrice qui donne 50% de l'activité de piégeage du radical libre DPPH (IC_{50}) correspondant respectivement au BHA, Vitamine C, EM, EA et JPG. Ces derniers sont regroupés dans **le tableau 11**.

Tableau 11: Concentration inhibitrice IC_{50} (mg/ml) du radical DPPH.

	EM	EA	JPG	BHA	Vit C
IC_{50} (mg/ml)	0.054±0.005	0.032±0.006	0.0012±0.001	0.010±0.002	0.013±0.004

La valeur d'IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (Activité antioxydante I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité anti-radicalaire d'un composé est appréciable.

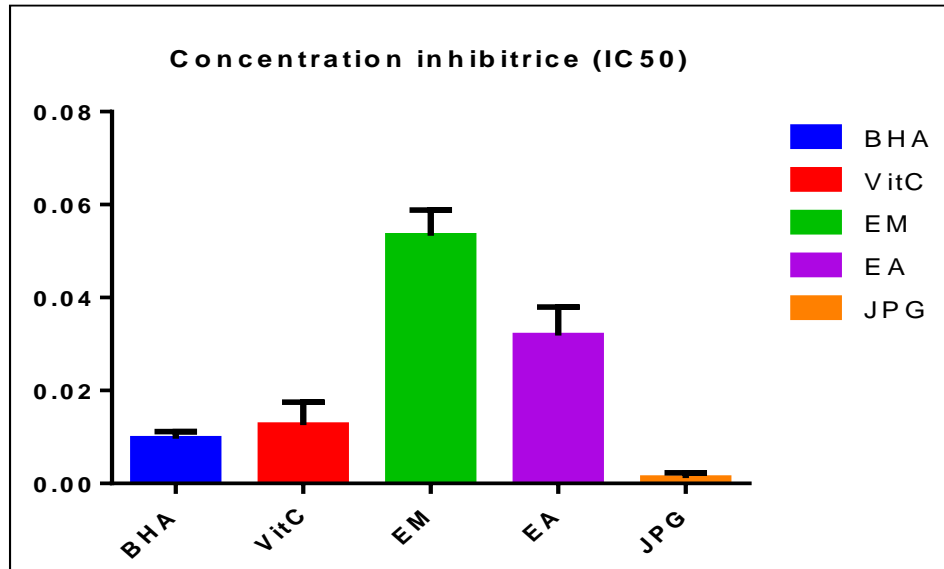


Figure 12: Concentration inhibitrice IC₅₀ du radical DPPH des différents extraits du grenadier et des antioxydants de références

BHA : hydroxyanisole butylé ; **VitC** : Vitamine C ; **EM** : Extrait méthanolique ; **EA** : extrait aqueux ; **JPG** : Jus de *Punica granatum*.

L'analyse du tableau 11 et de la figure 12, montre que le jus brut du fruit de *Punica granatum* présente la plus faible valeur d'IC₅₀. Cela signifie que son pouvoir antioxydant est plus important que celui des antioxydants de référence et des extraits d'écorces. Toutefois ces valeurs restent comparables. Nous citons, l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux qui ont exprimé des IC₅₀ de l'ordre 0.054, 0.032 mg/ml, respectivement. Alors que pour le jus brut, un important pouvoir antioxydant qui se traduit par une valeur de la IC₅₀ de l'ordre de 0.0012 mg/ml.

Nous pouvons dire que le fruit de *Punica granatum* est un antioxydant naturel.

II.1.9.6.2. Réduction du fer : FRAP (*ferric reducing antioxidant power*)

La figure 13 rapporte le pouvoir réducteur des extraits organiques et du jus brut de *Punica granatum* à différentes concentrations comparé à celui de l'acide ascorbique.

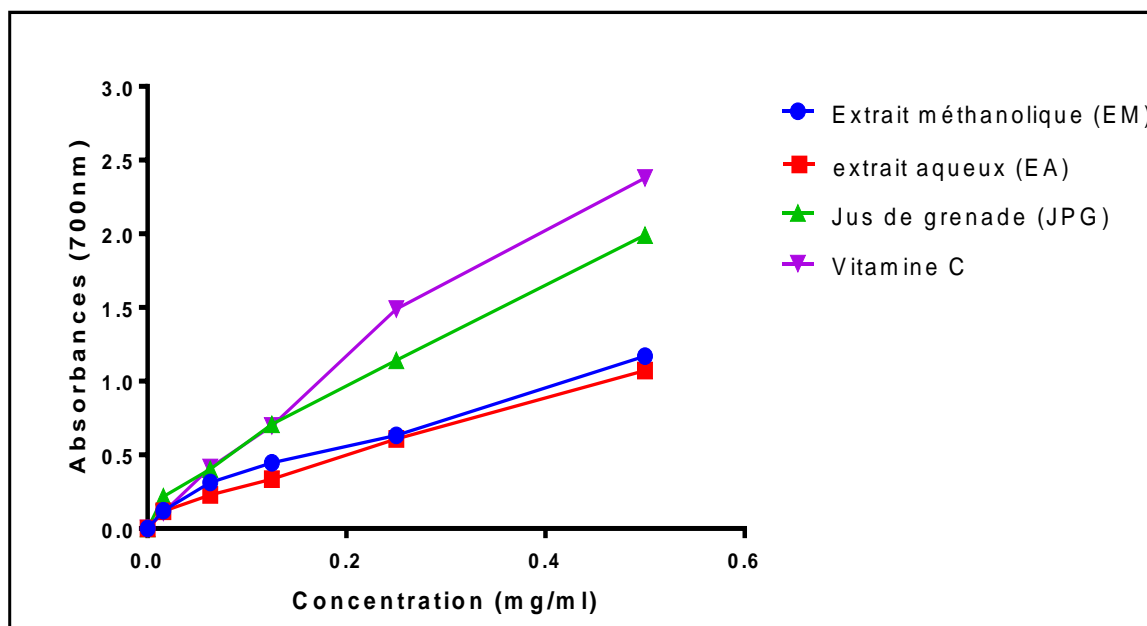


Figure 13: Pouvoir réducteur des extraits (EM, EA, JPG) de *Punica granatum* testé par la méthode FRAP

L'augmentation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP correspond à une grande capacité de réduction du Fe^{3+} . Cela se traduit par l'augmentation de l'absorbance à 700nm.

La figure 13 indique clairement que le pouvoir réducteur sur le fer ferrique Fe^{+++} en fer ferreux Fe^{++} varie linéairement avec la variation de la concentration en extrait. Cela est en accord avec les résultats de méthode précédente.

A partir des résultats rapportés dans la figure 14, nous avons remarqué une augmentation de l'activité du jus de fruit avec l'augmentation de la concentration. D'autre part, on constate que le pouvoir réducteur des deux extraits (EM, EA) est loin de celui du JPG et de l'antioxydant de référence. Une concentration de 0.063 mg/ml de JPG et de la vitamine C correspond à une absorbance de l'ordre de 0.402 et 0.434, respectivement. Alors qu'il faut 0.25 mg/ml d'extrait méthanolique et aqueux pour donner presque les mêmes absorbances.

La figure 14 montre l'effet réducteur des différents extraits à une concentration de 0.5mg/ml

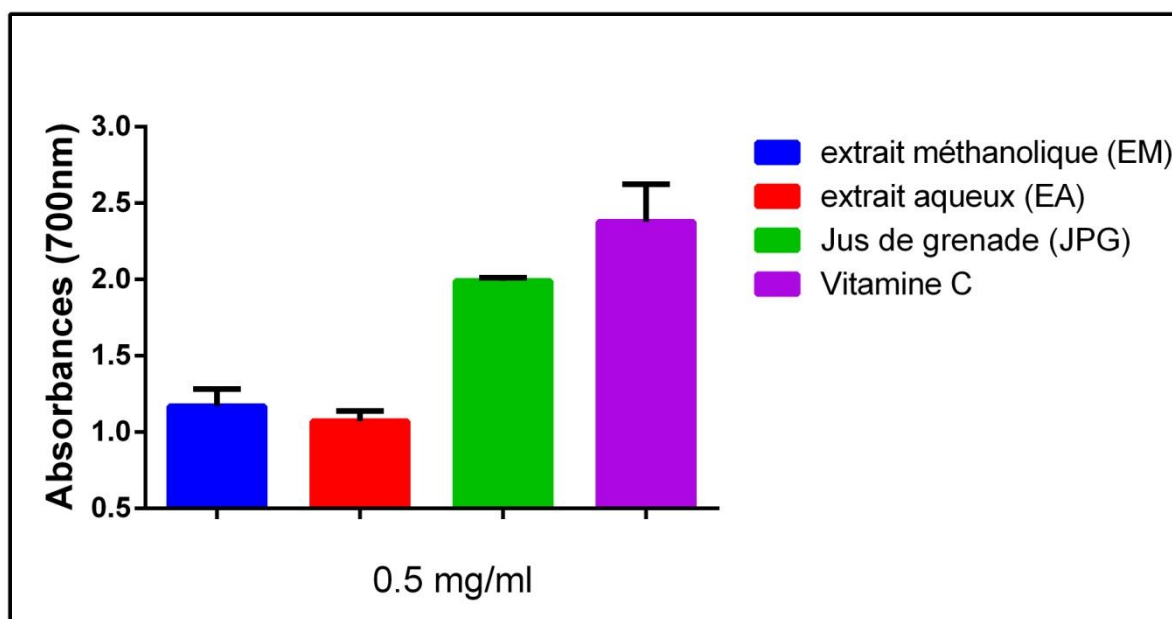


Figure 14: Pouvoir réducteur des différents extraits (EM, EA, JPG) de *Punica granatum* testés par la méthode FRAP à une concentration de 0.5 mg/ml.

Nous pouvons voir clairement sur la figure 14, l'important pouvoir réducteur du jus brut du fruit du grenadier d'une part, par rapport au pouvoir réducteur des extraits méthanoliques et aqueux des épicarpes. Et d'autre part, par rapport au pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

Nous pouvons aussi exprimer le pouvoir réducteur des extraits et de l'antioxydant de référence par la valeur par laquelle un extrait atteint la valeur 0.5 de l'absorbance. Cette valeur peut être appelée la CE_{50} (Concentration efficace). Le tableau ci-dessous rapporte les valeurs de la CE_{50} des différents extraits étudiés du fruit de *Punica granatum* L.

Tableau 12: Pouvoir réducteur des extraits de *P. granatum* exprimé en CE_{50}

Extraits	CE_{50} (mg/ml)
Extrait méthanolique	0.173±0.010
Extrait aqueux	0.211±0.009
Jus de fruit	0.095±0.001
Vitamine C	0.079±0.024

Le jus de fruit et la vitamine C montre des EC_{50} faibles (0.095 ± 0.001 et 0.079 ± 0.024 mg/ml, respectivement) par rapport aux extraits organiques : méthanolique (0.173 ± 0.010 mg/ml) et aqueux (0.211 ± 0.009 mg/ml).

II.1.9.6.3. Décoloration du β -carotène

La figure 15 rapporte le pouvoir antioxydant testé par la méthode de décoloration du β -carotène des différents extraits organiques de l'écorce et du jus de fruit de *Punica granatum*.

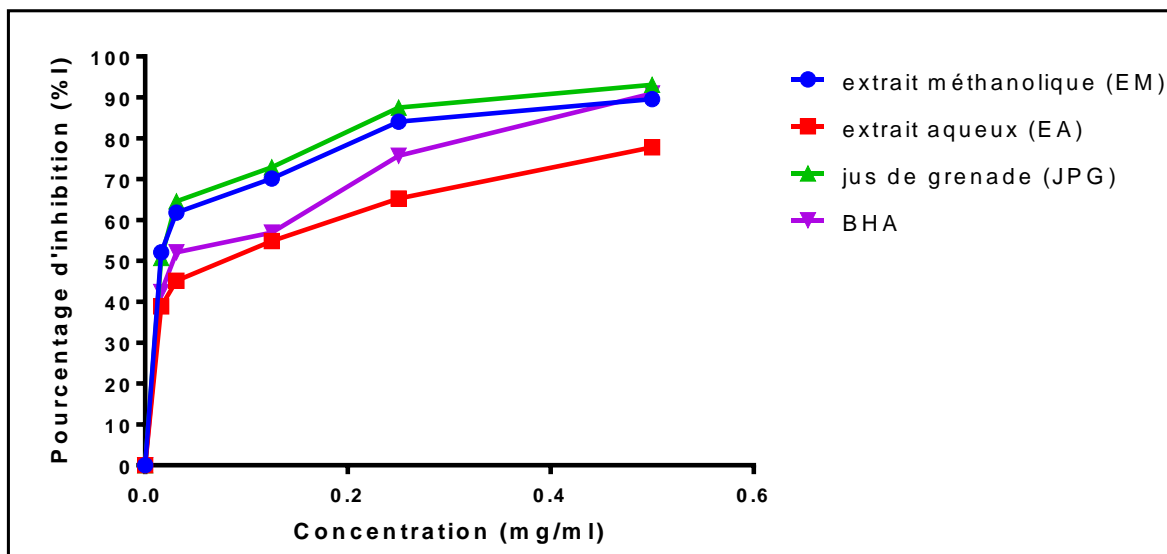


Figure 15: Pouvoir antioxydant des extraits organiques et du jus de fruit de *Punica granatum* testé par la méthode de la décoloration du β -carotène.

Nous constatons que les extraits organiques ont présenté des réponses différentes vis-à-vis de la décoloration du β -carotène. La plus importante activité antioxydante a été exercée par l'extrait méthanolique avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 89.58 ± 2.09 %. Alors que l'extrait aqueux a exercé un effet antioxydant plus au moins faible (77.78 ± 1.20 %).

Par contre, nous remarquons clairement que le jus de fruit (JPG) de *Punica granatum* exerce un fort effet protecteur (antioxydant) sur le β -carotène avec des pourcentages d'inhibition qui arrivent jusqu'à 93.06 ± 3.18 %. Pour le contrôle positif, nous remarquons clairement que le BHA exerce un faible effet antioxydant comparativement avec l'extrait méthanolique de l'écorce et le jus de grenade.

II.1.10. Discussion

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs. Leur utilisation en phytothérapie connaît de nos jours un intérêt sans précédent. Une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

Le fruit du grenadier (*Punica granatum* L.) est l'un des fruits les plus populaires en Algérie. Les parties comestibles des grenades peuvent être consommées fraîches ou sous forme transformée. Il renferme des composés précieux dans différentes parties dont des effets fonctionnels et médicaux tels que les effets antioxydants, anticancéreux et anti-athérosclérotiques ont été confirmés (**Mertens-Talcott et al., 2006; Perze-Vincent et al., 2002**). De nombreux scientifiques à travers le monde ont étudié les composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces et des jus de grenade de nombreuses variétés. Cette étude a été entreprise pour étudier les propriétés bioactives des extraits d'écorces et du jus de grenade extrait d'une variété locale.

Dans un premier lieu, l'étude pomologique des fruits de grenade du cultivar étudié Doux de Messaad, a révélé que le poids moyen des fruits, des arilles et des écorces étaient respectivement de 264.90g, 154.10g et de 109.43g. **Meziane et ses collaborateurs (2016)**, rapportent que le poids moyens des fruits de Doux de Messaad est de 206.42 g. Ce résultat est légèrement inférieur au notre. Il est intéressant de noter que les deux récoltes ont été faites dans la même station expérimentale de la même région (la Mitidja). Seulement l'une a été faite en Octobre 2013 et l'autre en Octobre 2014. Ceci s'expliquerait par le fait que le poids est une caractéristique variétale qui peut fluctuer en fonction du cultivar et des conditions écologiques (**Shulman et al., 1984**). Ce fait suggère que le poids des fruits pendant la maturité dépend du cultivar et fournit des informations précieuses pour les agriculteurs et les transformateurs (**Nuncio-Jauregui et al., 2015**).

Dans des travaux antérieurs menés par **Zarei et al. (2011)**, le poids moyen des fruits aux trois différents stades de maturation comprenait respectivement (76.71, 150.32 et 235.09) g, pour 20, 80 et 140 jours après la mise en fruit. Le poids des fruits a augmenté progressivement au cours de la maturation des fruits. **Al-Maiman et Ahmad (2002)** ont rapporté également que l'augmentation du poids du fruit variait en fonction des cultivars et des conditions

écologiques. Ce qui est en accord avec nos résultats, car pour la réalisation de cette étude nous avons récolté les fruits au troisième stade de maturation.

Ces résultats sont dans la même gamme de variation du poids moyen de la grenade, avancée par plusieurs auteurs : 204.3 à 288 g pour des cultivars iraniens (**Tehranifar et al., 2010**), 101.3 à 549.7 g pour des cultivars tunisiens (**Zaouay et al., 2012**), 206.6 à 506.67 g pour des cultivars marocains (**Hmid, 2013**), 277 à 280 pour des cultivars égyptiens (**Ismail et al., 2014**), et de 189.4 à 595.9 g pour des cultivars croates (**Radunić et al., 2015**).

Les arilles sont la partie comestible des fruits de grenade, contenant le jus, la pulpe et les graines. Ainsi, le fait de connaître ces caractéristiques permet aux producteurs et aux transformateurs de mieux promouvoir ce fruit. Les arilles ont une valeur économique et sont donc les traits les plus importants ciblés par les cultivateurs et l'industrie alimentaire (**Martinez et al., 2012 in Meziane et al., 2016**). Pour le même cultivar, **Meziane et al. (2016)** ont trouvé une valeur de 270g.

Par ailleurs, ce résultat est similaire à ceux rapportés précédemment ; En Turquie, le nombre d'arilles par fruit varie de 118 à 335g (**Durgaç et al., 2008**), de 164.50 à 169.15 g en Inde (**Ghadge et Jadhav, 2015**), tandis qu'à Oman il varie de 500 à 651 (**Al-Said et al., 2009**). Chaque arille est dérivé d'un ovule (**Wetzstein et al., 2011**) ; Par conséquent, le nombre d'arilles par fruit dépend du pourcentage d'ovules qui ont été fécondés avec succès.

En outre, le rendement en arilles est une propriété souhaitable du point de vue du consommateur ainsi que pour le traitement industriel des jus (**Valero et Ruiz-Altisent, 2000**). De ce fait, le rendement en arilles est de 58.17%. Cette valeur est presque similaire à celle trouvée par **Meziane et al. (2016)** qui variait entre 61.66 % pour BM11 et 66.55% pour DM. Elle est également comparable à celles des cultivars iraniens (57.86 à 75.48%) (**Akbarpour et al., 2009**) et des cultivars marocains (53.4 à 61.2 %) (**Fawole et Opara, 2013**).

Le pourcentage de jus de notre cultivar de grenadier DM est de 79.99% ; il est plus élevé que les cultivars étudiés par **Meziane et al. (2016)** dont le pourcentage en jus variait de 36.67% (BM11), 45.33 (DM) et 53,33% (DK).

Une autre caractéristique telle que le poids moyen des écorces a été enregistrée. Cette valeur (109.43g) n'est pas en accord avec celle (46.19 g pour le Doux de Messaad) trouvée par **Meziane et al. (2016)**, et celles (30.12 - 51.46 g) trouvées par **Ismail et al. (2014)**. Par contre, elle est semblable à celle (109.54g) rapportée par **Mansour et al. (2011)**.

En termes de qualité d'un fruit, les acides et les sucres sont des composants importants qui fournissent un goût et une saveur caractéristiques aux fruits et à leurs produits. Les principaux sucres solubles dans les grenades sont le glucose et le fructose (**Al-Maiman et Ahmad, 2002**).

L'acidité titrable, la teneur en solides solubles et la teneur en pH du cultivar étudié étaient de 0.47%, de 27.50 ° Brix et de 4.12.

Meziane et al. (2016) indiquent également que le jus de Doux de Messaad a révélé un pH élevé de l'ordre de 4.09 alors que l'acidité titrable était de 0.41%. **Sarkhosh et al. (2009)** rapportent que les fruits mûrs, qui avaient une faible teneur en acide, avaient un pH correspondant élevé. Une autre étude menée auparavant par **Gozlekci et Kaynak (2000)**, confirmerait que le pH du jus est assez élevé au début de la formation du fruit puis il diminue rapidement en juillet. Un léger accroissement du pH du jus est observé en août, septembre et octobre en raison de la maturation des fruits.

En ce qui concerne la teneur en solides solubles. Cette dernière est de 27.50 (°Brix), supérieur à celle (18.64 °Brix) trouvée par **Meziane et al. (2016)**. Dans d'autres études, le TSS variait entre 10.5 % (Kazil et Anar) et 19.0 % dans la sélection 303 de Ganesh et Gulsha Red (**Khodade et al., 1990, Agrawal et Chandra, 1991 ; Hepaksoy et al., 1998 ; Barone et al., 2001 ; Al-Maiman et Ahmad, 2002 ; Fadavi et al., 2005 ; Ferrara et al., 2011, Zaouay et al., 2012, Fawole et Opara, 2013**).

Dans une étude réalisée par **Al-Said et al. (2009)** dans le Sultanat d'Oman, les teneurs en TSS des cultivars Jabal 1, Jabal 2, Jabal 3 et Wild variaient entre 13.7 et 15.2%, tandis que **Tehranifar et al. (2010)** ont constaté que dans vingt cultures iraniennes, cela variait entre 12.8 et 15.1°Brix. Alors que pour les cultivars marocains, la teneur en TSS variait entre 15.3°Brix (cultivar Sefri) et 17.6°Brix (cultivar Bouaâdime).

Ces grandes différences peuvent non seulement être dues à une variation génétique, mais aussi à des critères différents pour la sélection du temps optimal de récolte (**Hernández et al., 2014**).

Gozlekci et Kaynak (2000) ont signalé que la teneur en solides solubles augmentait régulièrement pendant la période de développement des fruits. L'augmentation était assez élevée, surtout en septembre et octobre, lorsque les fruits étaient sur le point d'être récolter. Dans une autre étude, la teneur en solides solubles a augmenté progressivement au cours du

développement des fruits et a atteint 11-14% et de 13-14% à la mi-août pour les cultivars Mule's Head et Wonderful respectivement. Ensuite, ces valeurs ont atteint 14-15% pour le cultivar Mule's Head et 15-16% pour le cultivar Wonderful à la fin de Septembre.

L'augmentation de la teneur en solides solubles pourrait s'expliquer par l'augmentation de la teneur en sucre (glucose et fructose) des arilles en conséquence du développement et de la maturation des fruits, comme il a été rapporté par **Shulman et al. (1984)**. Cependant, **Nuncio-Jáuregui et ses collaborateurs (2015)** ont indiqué que ces valeurs doivent être prises avec précaution car seuls des niveaux de traces de sucres ont été détectés par HPLC et donc le TSS ne représentait pas les sucres mais d'autres composés hydrosolubles. Par conséquent, il n'est pas tout à fait approprié de comparer les valeurs de TSS ou MI avec celles de fruits mûrs ou de jus préparés avec ce type de fruit.

A partir de la valeur de TSS et de l'acidité titrable, nous avons pu établir la classification de notre cultivar étudié, selon l'indice de maturité (IM) qui exprime le ratio entre le TSS et l'AT d'un jus. De ce fait, nous notons que le Doux de Messaad est de nature douce (IM égale à 58.95).

Dans certains cultivars marocains, cet indice variait de 37.4 dans Bouaâdime à 77.6 dans Ounk Hman (**Martínez et al., 2012**). D'autres auteurs ont également mentionné de larges intervalles pour ce paramètre; **Viswanath et al. (1999)**, par exemple, ont obtenu des valeurs d'IM allant de 29.1 à 93.3. Le cultivar Kandhari Hansi a présenté un IM de 95.16 (**Nirmal-Sharma et Bist, 2005**). Le cultivar Bhagwa présente un IM de 41.83 (**Fawole et Opara, 2013**). Dans une étude portant sur vingt cultivars, **Chandra et al. (2013)** obtiennent des valeurs d'IM qui varient entre 4.31 et 28.62, ce qui est inférieur à celui présenté par le cultivar étudié dans ce travail. Selon **Chace et al. (1981)**, les grenades sont appropriées pour le marché frais lorsque leur teneur en acidité est inférieure à 1.8% et que leur IM est compris entre 7 et 12 ; lorsque l'IM varie de 11 à 16, les grenades sont très savoureuses.

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

Singh et al. (2014) ont conclut que l'extraction sélective d'antioxydants provenant de sources naturelles par un solvant approprié est très importante dans l'obtention d'extraits à forte activité antioxydante. Selon **Wang et al. (2004)**, les antioxydants à base de plantes sont extraits des matières premières ou des déchets de l'industrie alimentaire par les solvants

organiques tels que le méthanol, l'acétone et l'éther diéthylique. Ils rajoutent que le méthanol est un extracteur efficace pour une large gamme de polyphénols, et fréquemment utilisé à l'échelle de laboratoire et à l'échelle industrielle. Sachant qu'il est facilement accessible et à bon marché.

En 2002, Singh et ses collaborateurs ont extrait les antioxydants à partir de la peau et de la pulpe du fruit de grenadier en utilisant le méthanol, l'acétone et l'eau ; Ils ont constaté que le méthanol a donné le meilleur rendement.

D'autre part, **Sultana et al. (2008)** ont déclaré un rendement de 29.9 % pour les écorces de grenade, 24.6% pour la peau de banane, 21.5% pour les écorces d'agrumes et 16.4% pour la peau de pomme extraits avec 80% de méthanol. Le méthanol est généralement recommandé pour être un meilleur solvant pour l'extraction de composés antioxydants en raison de la polarité et de la disponibilité. L'efficacité et la capacité du méthanol peuvent augmenter en utilisant de l'eau comme co-solvant, en particulier lorsque l'extraction d'antioxydants de différents types est nécessaire (**Iqbal et al., 2005**)

En générale, les composés phénoliques dans les plantes sont des composés polaires, qui sont souvent extrait avec des solvants polaires tels que l'hydro-acétone et le méthanol. Les profils phénoliques différencieraient également quand différents solvants sont utilisés (**Kylli, 2011**).

Dans ce même contexte, **Li et al. (2006) ; Aderkani et al. (2011)** considèrent qu'une combinaison de différents solvants peut être plus efficace pour extraire les antioxydants parce que les antioxydants peuvent différer par leur solubilité dans les différents solvants.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines, les stéroïdes et tritérpénoïdes, les carbohydrates et les glycosides. Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Hagir et ses collaborateurs (2016)**, qui ont révélé la présence de tritérpénoïdes, de stéroïdes, de flavonoïdes, de tanins, d'alcaloïdes, de glycosides et de saponines dans les différents extraits d'écorces de fruit de *P. granatum* à savoir l'extrait de chloroforme, l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux.

Des résultats similaires ont été également rapportés par **Bhandary et al. (2012) ; Hegde et al. (2012) ; Uma et al. (2012) ; Chebaibi et Filali (2013) ; Moorthy et al. (2013) ; Narasimha et al. (2015) ; Sajjad et al. (2015) ; Deore Leena et al. (2016) ; Kesur et al. (2016)**

Egalement, **Ozcal et Dinc (1994)** indiquent que les flavonoïdes et les tanins sont les composés les plus abondants dans l'écorce de cette plante.

Par ailleurs, les travaux de recherche effectués par **Ali en 2016**, dans le but d'étudier l'influence du jus de fruit brut du grenadier en tant que produit riche en composés phytochimiques par rapport à d'autres jus de fruits (fraise et mangue) sur les caractéristiques du yaourt liquide, indiquent que l'analyse phytochimique du jus brut de *P. granatum* a mis en évidence la présence de plusieurs composés tels que les flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, saponines, glycosides, tritérpénoïdes & stéroïdes et la vitamine C. Alors qu'ils ne sont pas présents dans le jus de fraise brut. Il note également l'absence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de glycosides et de saponines dans le jus de mangue brut.

Toutefois, la composition chimique de la grenade et de ses produits dépend du cultivar, de la région de culture et du climat, du stade de maturité du fruit, des pratiques culturelles et des systèmes de fabrication (**Badenes et al., 1998, Toor et al. , 2006, Raffo et al., 2006, Boroyov-Neori et al., 2009, Zarei et al., 2011**).

La grenade est connue pour être l'un des fruits les plus riches en polyphénols. En particulier, l'écorce de fruits contient des quantités élevées de composés phénoliques, tels que les acides puniques, les acides galliques, ellagiques et les anthocyanes (**Bingham et al., 2003 ; Fisher et al., 2011**). Des études ont également rapporté que le contenu phénolique des écorces de grenade était 10 fois plus élevé (249,4 mg / g) que celui trouvé dans la pulpe (24,4 mg / g) (**Li et al., 2006**).

L'étude qualitative a été confirmée par une analyse quantitative des extraits organiques de l'écorce et du jus frais du fruit de *Punica granatum*, basée sur le dosage des polyphénols totaux, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables /condensés, les proanthocyanidines et les anthocyanes. Dans cette composition, nous constatons que le fruit de *Punica granatum* est quantitativement riche en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, anthocyanes et tanins). Ces résultats nous indiquent que les extraits d'écorce de grenade étudié (EM et EA) sont majoritairement constitué de polyphénols totaux (227.92 et 92.60 mg EAG/g) et de tanins hydrolysables (214.28 ± 1.79 et 103.50 ± 0.39 mg EAT/g). Leur composition en flavonoïdes est relativement faible (31.34 ± 0.26 et 21.67 ± 0.09 mg EQ/g).

Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux trouvés par **Elfalleh et al. (2012)** avec 85.60 ± 4.87 mg EAG/g de polyphénols totaux pour l'extrait méthanolique et 53.65 ± 4.13 mg EAG/g de polyphénols totaux pour l'extrait aqueux.

Ils sont également plus élevés que ceux trouvés par **Kansoula (2016)** où une teneur en polyphénols dans l'extrait méthanolique de l'ordre de 190 ± 5.2 mg EAG/g a été enregistrée. Une étude comparative des extraits méthanoliques d'épicarpes de quelques cultivars perses, établis par **Ardekani et ses collaborateurs (2011)**, a présenté des résultats dans la même gamme de variation $98,24 \pm 4,81$ à $226,56 \pm 18,98$ mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait, respectivement.

L'étude de **Saad et al. (2012)**, sur les extraits aqueux d'épicarpes non lavés et lavés de la même variété de grenadier à savoir la variété Chelfi, a rapporté des teneurs en polyphénols de l'ordre de 88.0 ± 16.5 et 77.5 ± 3.0 mg EAG/g. Ces résultats sont semblables aux nôtres.

Une autre étude faite sur plusieurs cultivars de grenadiers égyptiens a indiqué que les extraits aqueux et méthanoliques de la variété Wardy contiennent le pourcentage le plus élevé en polyphénols totaux ($246,37 \pm 4,61$ et $214,91 \pm 3,29$) suivi par Assuity ($224,62 \pm 4,84$ et $190,44 \pm 3,02$); Nab El Gamal ($193,39 \pm 3,79$ et $148,13 \pm 2,99$) ; Manfalouty ($189,18 \pm 3,07$ et $163,70 \pm 3,47$) et Balady (179.30 ± 4.82 et 158.30 ± 4.15) mg GAE/g (**Abdel-Hady, 2013**).

Saleh et al. (2017) ont récemment rapporté que la plus forte teneur en polyphénols était présente dans l'extrait aqueux avec une valeur de 810 ± 9.45 mg EAG/g.

Dans cette étude, les résultats obtenus ont confirmé ceux de **Wang et al. (2011)** démontrant que les écorces de grenade extraites avec le méthanol donne un rendement plus élevé par rapport à l'eau et ils attribuent cela aux différences de polarité entre les solvants, et par conséquent la solubilité du soluté dans le solvant. De plus, l'efficacité du méthanol dans l'extraction des différents composés phénoliques de différentes parties végétales a été conclu par plusieurs auteurs (**Turkmen et al., 2006 ; Mohamed et al., 2013 ; Rabeta et Faraniza, 2013 ; Ali et al., 2014 ; Uddin et al., 2014**)

Selon l'extraction des composés phénoliques est régit par plusieurs facteurs qui influent directement sur les teneurs de ces molécules, parmi ces facteurs ; l'augmentation de la température de l'extraction, le temps de contact du matériel végétal avec le solvant d'extraction, ainsi que la diminution de la taille des particules pour augmenter le coefficient de diffusion du solvant.

En ce qui concerne le Jus brut de *Punica granatum*, la teneur en polyphénols (1600.46 mg EAG/L), est comparable à celles trouvées par **Hmid (2013)** dans les jus de dix-huit cultivars marocains (teneurs comprises entre 1284.42 – 9476.32 mg/L). Elle est semblable également à celles trouvées par **Gözlekçi et al. (2011)** dans l'étude des jus de certains cultivars turques dont la teneur en polyphénols totaux la plus élevée a été enregistré dans "Lefan" (1551,5 mg / L) suivi par "Asinar" (1307,3 mg / L) et "Katirbasi" (1229,5 mg / L).

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par **Ferrara et al. (2011)** pour les jus de grenades de différents cultivars d'Italie (300.3 -1320.8 mg EAG / L), et par **Akhavan et al. (2015)** $220.0 \pm 1.4 - 1266.8 \pm 44.2$ mg EAG/L pour les jus de grenade de dix cultivars Iraniens. Et supérieurs à ceux trouvés par **Borochoy-Neori et al. (2009)** dans son étude sur les jus de neufs cultivars en Palestine occupée (990- 2260 mg EAG/g) et par **Sepúlveda et al. (2010)** pour le jus de grenade de différents cultivars du Chili (670.6-1280.0 mg EAG/L).

Toutefois, dans d'autres études, les teneurs phénoliques totales ont montré des différences significatives et étaient de : 144-10080.6 mg EAG/L (**Tezcan et al., 2009**), 2370.6-9850.32 mg EAG/L (**TehraniFar et al., 2010**), 2015 -5186 mg EAG/L (**Fischer et al., 2011**), 7570.30-8410.30 mg EAG/L (**Zhuang et al., 2011**), 2700.25- 8400.94 mg EAG/L (**Rajasekar et al., 2012**) 1598.96 – 2315.10 mg EAG/L (**Mahmoud et Ibrahim, 2013**) et de 1880.36 – 2150.45 mg EAG/L (**Lantzouraki et al., 2015**).

Selon des études antérieures, les différences dans la composition des composés phénoliques pourraient être attribuées à de nombreux facteurs, y compris la variété, la maturité des fruits les pratiques agricoles, l'aire de culture, la saison de récolte des fruits, les conditions climatiques et les conditions de stockage des fruits de grenade (**Sepúlveda et al., 2010 ; El Kar et al., 2011 ; Fawole et Opara, 2013**)

Dans leur étude sur des échantillons de grenade de la variété « Ganesh » à différents stades de développement, **Kulkarni et Aradhya (2005)**, ont observé que les valeurs de PT ont diminué approximativement de 74% pendant la croissance et la maturation des fruits.

Weerakkody et al. (2010) ont constaté que le contenu en polyphénols totaux a diminué d'environ 50% dans le jus « Wonderful » en Australie, pendant le développement des fruits. Le contenu variait de 1710 mg EAG/ L (fruit immature) à 790mg EAG/ L (fruit mature). **Nuncio-Jáuregui et al. (2014)** ont également enregistré une diminution de la teneur en polyphenols au fur et à mesure de la maturation, de 3783 à 3282 mg EAG/L. Quant à

Schwartz et al. (2009) ont signalé une diminution de la teneur en composés phénoliques au cours de la maturation des fruits de 3.9 à 1.9 mM. De même, **Fawole et Opara (2013)** ont rapporté une diminution de la teneur en TP de 1052 à 483 mg GAE 100 mL⁻¹).

La diminution de la teneur totale en composés phénoliques est attribuée à l'oxydation des polyphénols par la polyphénol oxydase présente au cours de la maturation des fruits (**Kulkarni et Aradhy, 2005 ; Schwartz et al., 2009 ; Fawole et Opara, 2013**).

Plusieurs auteurs ont démontré que le contenu en polyphénols totaux est réduit dans le jus de grenade pendant le mûrissement et la maturation, et que les métabolites antioxydantes changent en réponse au stress abiotique (**Mirdehghan et Rahemi, 2007; Shwartz et al., 2009 ; Weerakkody et al., 2010; Zarei et al., 2011 ; Fernandes et al., 2015**).

Sachant également que les résultats du dosage des composés phénoliques n'indiquent pas les valeurs exactes en polyphénols, puisque malgré sa grande sensibilité, la méthode Folin-Ciocalteu peut présenter des problèmes d'interférence avec d'autres facteurs de réduction tels que les acides aminés (Tyrosine, Tryptophane) et les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose (**Padda et Picha, 2007 ; Fischer et al., 2011**).

Par ailleurs les valeurs trouvées en flavonoïdes totaux dans les deux extraits à savoir l'extrait méthanolique et aqueux se rapprochent de celles rapportées par **Ardekani et al. (2011)** dans des extraits méthanoliques des écorces de 9 cultivars Iraniens (18.61 – 36.40 mg EC/g). Et à celles obtenues par **El falleh et al. (2012)** dans les extraits méthanolique et aqueux des écorces de grenades tunisiennes (51.52 ± 8.14 et 21.03 ± 1.62 mg d'équivalent Rutine/g, respectivement).

Shiban et al., (2012) ont montré que la composition de l'extrait méthanolique en flavonoïdes est de 56.4 mg ER/g. Ce qui est nettement supérieur à la valeur obtenue.

Comme indiqué par **Souleman et Ibrahim (2016)**, les extraits aqueux des écorces de différents cultivars égyptiens ont des teneurs en flavonoïdes variables, allant de 21.72 – 34.28 mg ER/g. Ces résultats sont comparables aux nôtres.

Et celles trouvées par **Hmid (2013)** dans des cultivars marocains (144.46 - 569.89 mg d'équivalent Rutine / L).

D'autres auteurs ont également trouvés des résultats dans la même gamme de variation : entre 135 – 636 mg EQ/L de jus de 9 écotypes tunisiens, par **El kar et al., (2011)** ; entre 514 - 570

mg EQ/L de jus de deux cultivars syriens, par **Al-Halabi et al. (2015)** ; entre 45 – 335 mg EQ/L de jus de 10 cultivars de 4 régions chinoises, par **Li et al., (2015)**.

Guo et al. (2008) ont indiqué que la valeur obtenue pour le contenu des flavonoïdes du jus de grenade est de 174 mg/L, alors que pour celui de la pomme est de 92 mg/ L. Dans la même étude, ils ont conclu que la consommation quotidienne de jus de grenade est potentiellement meilleure que le jus de pomme en termes de l'amélioration de la fonction antioxydante chez les personnes âgées.

Par ailleurs, une diminution d'environ 2 fois de la teneur des flavonoïdes au niveau des épicarpes a été observée entre les stades de maturation ; faible (821 mg EQ/g) et moyen-élevé (492 mg EQ/g d'extrait). En revanche, une augmentation de la concentration de ces composés a été observée dans les graines et le jus de grenadier lors de la comparaison des stades de maturation faible et moyen-élevé. Dans les graines, les valeurs les plus élevées de flavonoïdes ont été obtenues dans les stades de maturation moyenne et moyenne-élevée, 2.9 et 2.7 mg d'équivalent quercétine par g d'extrait, respectivement. Le jus extrait du fruit à maturité moyenne a eu la plus forte teneur en flavonoïdes (165 mg EQ par 100 mL) (**Fernandes et al., 2015**). Ces résultats sont différents de ceux décrits par **Fawole et Opara (2013 a,b)**, qui ont observé une diminution des flavonoïdes dans le jus au cours de la maturation des fruits. Plus précisément, dans la première étude, les valeurs de flavonoïdes dans 100 mL de jus ont diminué pendant la maturation du cultivar Bhagwa de 1459.94 à 201.57 mg d'équivalent de catéchine (CAE) en 2011 et de 1045.62 à 150.99 mg ECA en 2012. Ces travaux de recherche, nous confirment les résultats obtenus de notre étude car les fruits ont été récoltés au troisième stade de maturité. Et vu que c'est une variété précoce, les fruits au mois d'octobre étaient déjà à maturité complète.

Les tannins peuvent être classés en deux groupes: tanins hydrolysables et tanins condensés (également appelés tanins de catéchine ou proanthocyanidines). Les tanins hydrolysables peuvent être ensuite divisés en gallotanins, qui fournissent du sucre et de l'acide gallique à l'hydrolyse, et les ellagitanins qui, par hydrolyse, ne donnent pas seulement du sucre et de l'acide gallique, mais aussi de l'acide ellagique (**Lamy et al., 2016**).

L'écorce de grenade est riche en tanins hydrolysables, principalement punicalin, pédonculagine et punicalagine (**Seeram et al., 2005**). Ils diffèrent des proanthocyanidines dans leurs structures chimiques. En plus des TH, les écorces de grenade contiennent des acides hydroxybenzoïques tels que les glycosides gallagiques (**Amakura et al., 2000**).

Ainsi le dosage des tanins hydrolysables montre des teneurs relativement proches pour les deux extraits d'écorces de grenadier étudié (214.28 mg EAT/g pour l'extrait méthanolique ; 103.50 mg EAT/g pour l'extrait aqueux). Ces teneurs sont importantes par rapport à celles trouvées par **El Falleh et al. (2012)**, dans l'EM et EA des épicarpes de grenade tunisienne (teneurs variées entre 139.63 et 62.71 mg EAT/g, respectivement). Et celles trouvées par **Çam et Hişil (2010)** dans l'extrait méthanolique et aqueux des écorces de grenade turque (260.2 ± 12.6 mg EAT/g pour l'EM et 82.6 ± 5.6 mg/g).

Nous constatons que l'extrait méthanolique se caractérise par la teneur la plus importante (47.78 mg EC/g) en tanins condensés et qui est plus importante que les teneurs rapportées par **Saad (2013)** (3.2 à 7.7 mg EC/g) ; **Li et al (2006)** (10.9 mg EC/g MS) et **Çam et Hişil (2010)** (3.7 à 9.5 mg EC/g MS).

Ces résultats montrent clairement que la fraction en tanins hydrolysables dans les écorces du fruit du grenadier est plus importante que celle des tanins condensés. **Saad (2013)** signalent également cette fluctuation entre les teneurs en tanins hydrolysables et tanins condensés dans les écorces des fruits de grenade des différents cultivars tunisiens. Ils expliquent cela par les différences génétiques et environnementales. D'autre part, ils justifient cette fluctuation par la distinction de l'épaisseur de l'écorce pour chaque échantillon étudié.

En ce qui concerne le jus de fruit de *Punica granatum*, la teneur en tanins hydrolysable (TH) et en tanins condensés (TC) est de 993.57 mg EAT/L et 317.02 mg EC/L, respectivement. Les résultats pour les TH, sont plus importants que ceux trouvés par **Hmid et al. (2016)** où les teneurs en TH de quelques jus de grenade marocaines variaient entre 216 -730 mg EAT/L. Contrairement à la teneur en TC qui est dans la même gamme de variation (251.9 – 648.7 mg EC/L).

Dans des travaux antérieurs, la composition des jus de grenade en tanins hydrolysables était de 539.20 mg/L. Alors que la teneur en tanins condensés était presque la même entre les cultivars locaux (251.9-644.7 mg/L) et étrangers (296.1 et 648.5 mg/L) (**Gil et al., 2000**).

El Kar et ses collaborateurs (2011) ont quantifié le contenu en tanins condensés de jus de grenade, obtenus à partir de 9 écotypes tunisiens (5 écotypes pour la variété Gabsi et 4 écotypes pour la variété Tounsi). Le contenu variait entre 350- 2550mg EC/L.

Les proanthocyanidines (PA) sont des produits finis oligomères et polymères de la voie de la biosynthèse des flavonoïdes. En plus de cette diversité, les polyphénols peuvent être associés

à divers glucides, acides organiques et les uns avec les autres. L'existence des proanthocyanidines dans les aliments communs, y compris les céréales, les fruits, les noix et les épices, affecte leur texture, leur couleur et leur goût. Toutefois, Ils sont de plus en plus reconnus comme ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine en raison de leur puissante capacité antioxydante et de leurs effets protecteurs sur la santé humaine ; réduire le risque de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et les cancers (**Dixon et al., 2005 ; Prior et Gu, 2005 ; Lee, 2010 in Wissam et al., 2012**)

Dans cette étude, les teneurs en proanthocyanidines des extraits méthanoliques et aqueux sont de l'ordre de 24.24 et 4.65 mg EC/g, respectivement. Ces valeurs sont plus élevées que celles publiées pour cinq cultivars de grenades largement répandus en Egypte, elles sont de l'ordre de 0.085 à 0.339 mg EC/g pour les extraits méthanoliques et de 0.080 à 0.318 mg EC/g pour les extraits aqueux (**Abdel-Hady, 2013**). D'autre part, **Middha et al. (2013)** ont montré également que l'extrait méthanolique renferme une teneur plus au moins importante en proanthocyanidine de l'ordre de 14.09 ± 1.56 tandis que, elle est de 9.09 ± 0.86 mg EC/g pour l'extrait aqueux.

L'extrait méthanolique des écorces de grenades récoltées au nord de l'île Maurice possède une teneur en proanthocyanidines de 2.48 ± 0.08 mg EC/g (**Rummun et al., 2013**)

Les anthocyanines, qui appartiennent à la famille des flavonoïdes, sont les principaux pigments responsables de la couleur des fruits de grenade. Six grands composés anthocyaniques ont été identifiés dans des fruits à grenade, y compris les mono- et diglucosides de la cyanidine (rouge), la pelargonidine (orange) et la delphinidine (pourpre) (**Gil et al., 1995 ; Hernandez et al., 1999 ; Fischer et al., 2011**). La variabilité de la couleur dans divers tissus et parmi différentes accessions de grenade provient de différents teneurs en anthocyanines et de différentes quantités relatives de ses dérivés (**Ben Simhon et al., 2015**). D'autres flavonoïdes et polyphénols peuvent également contribuer à certaines des couleurs jaunâtres observées dans les fruits de grenade (**Tanaka et al., 2008 ; Ben Simhon et al., 2015**).

Les anthocyanines sont des molécules commercialement importantes en raison de leurs propriétés bénéfiques à la santé et de couleurs attrayantes. Les avantages potentiels pour la santé des aliments riches en anthocyanines dérivés des plantes ont été examinés, en mettant l'accent sur le rôle des anthocyanines dans la prévention du cancer (**Wang et Stoner, 2008**), la prévention des maladies cardiovasculaires (**Wallace, 2011**), les effets antimicrobiens, anti-

inflammatoires (**Kong et al., 2003 ; Kowalczyk et al., 2003**) et des effets antioxydants considérables (**Schwartz et al., 2009**). Le contrôle de l'obésité, le contrôle du diabète et l'amélioration des fonctions visuelles et cérébrales (**Ghosh et Konishi, 2007 ; He et Giusti, 2010 ; Tsuda, 2012**).

Les anthocyanines contribuent également à la couleur du fruit, ce qui affecte de manière significative le succès du marché. En outre, les anthocyanines jouent un rôle important dans la protection des tissus végétaux contre l'irradiation UV (**Li et al., 1993 ; Hou et al., 2004**) et la photoinhibition (**Gould, 2004**). Il a été également montré que ces pigments doublent la durée de conservation des tomates en retardant la maturation excessive et en réduisant la sensibilité aux moisissures grises (**Bassolino et al., 2013 ; Zhang et al., 2013**).

Le taux des anthocyanes des extraits méthanoliques (EM), aqueux (EA) et du jus (JPG) est compris entre 14.41 ± 0.42 et 16.75 ± 0.34 mg ECG/g d'extrait ; 1586.39 ± 44.18 mg ECG/L de jus, respectivement.

Dans leur étude, **Elfalleh et al. (2011)** ont enregistré une teneur en anthocyanine plus importante dans l'extrait méthanolique (102.20 ± 16.42 mg ECG/g) que dans l'extrait aqueux (51.02 ± 10.33 mg ECG/g). Ce qui est le contraire des résultats trouvés dans notre étude.

La teneur en anthocyanines de notre jus est plus importante que celles rapportées par **Sepulveda et al. (2009)**, 170 – 1342mg ECG/L ; à celles trouvées par **Himd (2013)**, dans les jus marocains (teneurs variées entre 64.16 et 188.7 mg ECG/L) ; **Fawole et al. (2012)** pour trois cultivars de grenadier (Arkata, Bhagwa et Ruby) cultivés en Afrique du Sud (165.3 et 269.3 mg ECG/L) ; à celles de **Li et al. (2015)** entre 4 -160 mg ECy/L et aux teneurs trouvées par **Zhuang et al. (2011)** ($27.95 - 82.26$ mg ECy/L).

Hernández et al. (1999) indiquent que l'intensité de la couleur de la grenade augmente au cours la maturation, et diminue drastiquement après l'écrasement. L'intensité de la couleur rouge foncée dépendant de la concentration totale des anthocyanes et du profil anthocyanique (**Miguel et al., 2004**)

La teneur en anthocyanes totales diminue généralement pendant la préparation du jus; Ceci a un effet direct sur l'intensité de la couleur rouge foncé. L'effet de la méthode d'extraction du jus de grenade sur sa qualité et sa stabilité des anthocyanes a été évalué par **Miguel et al. (2004)**; Ils ont déclaré que la séparation des arilles manuellement et la centrifugation ultérieure ont considérablement diminué la teneur en cyanidine 3,5-diglucoside (composé

responsable de la couleur du jus de grenade) dans le jus par rapport à la compression des moitiés de fruits avec un compresseur électrique. Toutefois, la concentration de ces produits chimiques a diminué pendant le stockage, bien que la diminution fût beaucoup plus intense à température ambiante (15 ° C) que sous réfrigération (5 °C).

Turfan et al. (2011) ont évalué les effets des étapes de clarification et de pasteurisation sur les anthocyanes et la couleur dans le jus de grenade préparé à partir des arilles et des fruits entiers. Leurs résultats ont prouvé que la clarification a causé des pertes de 4% et 19% de la teneur en anthocyanes dans le jus des arilles et des fruits entiers, respectivement. Là encore, les effets de la pasteurisation sur les anthocyanes étaient minimes.

L'étude qualitative et quantitative a démontré que la composition chimique des fruits de *Punica granatum* diffère en fonction du cultivar, de la région de culture, de la maturité, de la pratique de la culture, du climat et des conditions de stockage.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits organiques et du jus frais du fruit de *Punica granatum* a été effectuée par trois méthodes conventionnelles, afin de tester ces extraits par rapport aux différents mécanismes réactionnels qu'impliquent ces tests antioxydants.

L'activité antioxydante du grenadier et de ses dérivés a été largement étudiée ces dernières années. Plusieurs études ont été publiées dans ce contexte. En raison de sa richesse en polyphénols, les écorces et le jus de grenade sont connus pour posséder une forte activité antioxydante.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette étude, suggèrent que les antioxydants naturels inhibent le radical DPPH au même titre que les antioxydants synthétiques (BHT, BHA et Vit C). Ceci est soutenu par les valeurs d'IC₅₀ ; Plus cette valeur est faible, plus l'activité antioxydante est élevée.

Les extraits organiques (méthanolique, aqueux) et le jus de fruit de *Punica granatum* ont présenté d'importants pouvoirs antioxydants, avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 0.054mg/ml, 0.032 mg/ml et de 0.0012 mg/ml, respectivement.

Zahin et al. (2010) rapportent qu'une concentration de 0.08mg/ml, l'extraction séquentielle des polyphénols d'écorces de grenade a donné des pourcentages d'inhibition de l'ordre de :

90.53%, 86.4% et 83.2% pour les fractions de méthanol, d'acétone et d'éthanol, respectivement.

Shiban et ses collaborateurs (2012) ont étudié l'activité antioxydante des extraits d'écorces de *Punica granatum* en utilisant deux méthodes ; la méthode FRAP et le piégeage du radical libre DPPH. Ils indiquent que l'activité antioxydante par le test de DPPH de l'extrait méthanolique a été considérablement élevée, à mesure que la concentration augmentait de 12.5 à 50 ppm. Et que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait méthanolique à 50 ppm était de 99.3 % tandis que celui de l'extrait aqueux était de 75.4%.

Dans une autre étude menée par **Kasliwal et Quadri (2016)**, l'écorce de grenade présentait une activité antioxydante très puissante. Dans une gamme de concentrations (5, 10, 15, 20 et 25 mg/ml) des extraits organiques d'écorces ; le méthanol a donné un pourcentage d'inhibition de 85.90% à 51.21% par rapport à la gamme de concentrations. A titre indicatif, la valeur d'IC₅₀ trouvée pour l'extrait méthanolique était de l'ordre de 20mg/ml.

Mansour et al. (2013) montrent que l'extrait méthanolique donne une activité plus élevée que l'extrait aqueux, les valeurs moyennes (IC₅₀) ont varié respectivement de 1.9 à 4.3 µg/ml et de 10.2 à 13.1 µg/ml. Contrairement à nos résultats ou l'extrait aqueux a présenté une activité plus élevée que l'extrait méthanolique.

Dans d'autres études, **Rajan et al. (2011)** ; **Manasathien et al. (2012)** ont révélé des valeurs d'IC₅₀ élevées pour les extraits aqueux d'écorces de grenade de différents cultivars et étaient de l'ordre de : 0.135 ±39.30 mg/ml et 0.151 ±2.70 mg/ml, respectivement.

Elfalleh et al. (2009) ont effectué une étude comparative de l'activité antioxydante par le test de DPPH, entre les extraits méthanoliques d'écorces et les jus de grenades de six cultivars tunisiens. Les valeurs d'IC₅₀ sont comparables dans les six écotypes, et variaient de 15.98 ±0.60 à 23.98±1.60 µl de jus/ml de DPPH et de 3.20±0.70 à 3.60±0.80 µg d'extrait méthanolique/ml DPPH.

Les corrélations entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques, en proanthocyanidines et en flavonoïdes de l'écorce de grenade, a été étudiée par **Wang et al. (2011)**. Les résultats obtenus indiquent une forte corrélation entre les composés phénoliques totaux ($R^2 = 0.98$) et le DPPH, mais il existe aucune corrélation avec les proanthocyanidines ($R^2 = 0.01$) et les flavonoïdes ($R^2 = 0.05$).

Dans de nombreux fruits et légumes, l'activité antioxydante peut être attribué au niveau de la teneur totale en polyphénols (**Gil et al., 2000 ; Sellappan et al., 2002 ; Rababah et al., 2005 ; Rosenblat et Aviram, 2006 ; Solomon et al., 2006 ; Ranilla et al., 2007**).

D'après **Gil et al. (2000)**, les principaux composés antioxydants du jus de grenade sont des tanins hydrolysables, mais les anthocyanes et les dérivés de l'acide ellagique contribuent également à la capacité antioxydante totale du jus. De même, **Tzulker et al. (2007)** ont expliqué que l'activité antioxydante du jus de grenade issu des arilles peut être attribuée dans une large mesure à la teneur totale en phénols et qu'elle est liée au niveau d'anthocyanes. Nos résultats correspondent à ceux de ces chercheurs. D'un autre côté, **Borochoy-Neori et al. (2009)** ont rapporté que la capacité antioxydante et la teneur totale en composés phénoliques solubles étaient linéairement corrélées ($R^2 = 0,98$) alors que la capacité antioxydante et la corrélation d'intensité de couleur rouge interne étaient faibles ($R^2 = 0,38$).

Les polyphénols sont composés de différents types de composés phytochimiques, dans lesquels l'une des classes dominantes des fruits sont les anthocyanines appartenant au groupe des flavonoïdes (**Rapisarda et al., 1999**). Les anthocyanines sont des pigments solubles dans l'eau qui sont principalement responsables de la couleur attrayante de nombreux fruits, y compris le jus de grenade, et ils sont bien connus pour leur activité antioxydante.

La constatation présentée ici nous permet de souligner deux points: (1) l'activité antioxydante du jus de grenade peut être attribuée, dans une large mesure, à la teneur totale en phénol; et (2) l'efficacité antioxydante semble être liée au niveau des anthocyanines. Conformément à nos données, les teneurs totales en phénols et en anthocyanines semblent être les principaux composants de l'activité antioxydante de différentes baies (**Prior et al., 1998 ; Aaby et al., 2005 ; Huang et al., 2012 ; Skrovankova et al., 2015 ; Marhuenda et al., 2016**), des figues (**Solomon et al., 2006**), des pommes et des pêches (**Rababah et al., 2005**). De même, une forte corrélation positive a été trouvée entre les teneurs antioxydantes et anthocyanines dans les graines d'haricots (**Ranilla et al., 2007**)

Par ailleurs, **Aloqbi et al. (2016)** rapportent une modeste activité antioxydante de la punicalagine et du jus de grenade. Les pourcentages d'inhibition causés par le jus de grenade étaient de 14.4%, 27.5% et 37.9% pour les concentrations (0.05, 0.1 et 0.15 mg/ml) respectivement, tandis que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en présence de punicalagine aux mêmes concentrations était (12.5%, 23.9% et 30.8%), respectivement.

Des composés phénoliques et des activités antioxydantes de dix jus obtenus à partir d'arilles et de grenades entières, cultivées dans le centre de recherche agricole de la province de Yazd, en Iran, ont été étudiés (**Akhavan et al., 2015**). Les principaux phénols dans les jus étudiés étaient punicalagine A (5.40-285 mg/L), punicalagine B (25.9-884 mg/L) et acide ellagique (17.4-928 mg/L). Le contenu phénolique et l'activité antioxydante du jus de grenade entière étaient significativement plus élevés que ceux des jus obtenus à partir des arilles de grenade du même cultivar. Cependant, le contenu (ou le manque) de punicalagines dans le jus de grenade n'était pas seulement affecté par la méthode d'extraction, mais aussi par le cultivar de grenade. Neuf anthocyanines individuelles ont été détectées et la teneur totale en anthocyanines variait de 1.8 à 175 mg /L.

D'autre part, **Gil et al. (2000)** ont signalé que la capacité antioxydante du jus de grenade était plus élevée que le vin rouge et le thé vert, en fonction de l'évaluation de l'activité de piégeage des radicaux libres et de la capacité de réduction du fer du jus. Dans une étude menée auparavant par **Guo et ses collaborateurs (1997)**, indiquent que les fruits ont une relation entre la composition antioxydante et l'activité antioxydante, et ceux avec une activité antioxydante élevée contiennent généralement plus d'antioxydants.

Le test FRAP traite les antioxydants contenus dans les échantillons comme réducteurs dans une réaction colorimétrique redox et la valeur reflète le pouvoir réducteur des antioxydants (**Huang et al., 2012**). Cette méthode a été utilisée fréquemment pour une évaluation rapide de la capacité antioxydante totale de divers aliments et boissons (**Benzie et Strain, 1996 ; Moyer et al., 2002**), les flavonoïdes (**Luximon-Ramma et al., 2002**), et les différents extraits de plantes contenant des polysaccharides (**Xu et al., 2009, Du et Xu, 2014**).

Le pouvoir réducteur d'un composé sert d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Deepa et al., 2009 ; Kanatt et al., 2010 ; Zheng et al., 2011**)

A la lumière de ces résultats, nous remarquons dans un premier lieu, une bonne activité antioxydante du jus de fruit de *Punica granatum*. Dans un second lieu, les extraits méthanoliques et aqueux d'épicarpes de grenade montrent un certain degré de pouvoir réducteur. Cependant, ce pouvoir réducteur est inférieur à celui de l'acide ascorbique, qui est connu pour être un fort agent réducteur.

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

Le pouvoir réducteur des antioxydants a été signalé comme étant le plus élevé dans l'extrait méthanolique sous la forme de 756.44 ± 78.4 mg d'extrait Fe^{II} / g suivi de l'acétone (659.61 ± 45.6 mg Fe^{II} /g d'extrait) et de l'acétate d'éthyle (495.37 ± 53.8 mg Fe^{II} /g d'extrait) (**Pradyuman et Ranjan., 2015**). Les variations de la capacité antioxydante des extraits méthanoliques peuvent être attribuées à des différences dans leur contenu phénolique (**Gil et al., 2000**). Parmi les neuf variétés d'épicarpes de grenade, la valeur du pouvoir réducteur était comprise entre 516.66 ± 118.71 à 699.97 ± 96.65 mg Fe^{II} / g d'extrait (**Reza et al., 2011**).

Elfalleh et al., (2012) rapportent que le pouvoir réducteur des jus de grenades de six cultivars tunisiens, variaient de 6.36 mmol/l à 8.65 mmol/l, avec une moyenne de 7.24 ± 1.24 mmol/l. **Ozgen et al., (2008)** ont trouvé des résultats similaires, une moyenne de 7.35 ± 0.21 mmol/l dans six cultivars de grenadiers du sud de la Turquie.

Par ailleurs, **Gil et al. (2000)** ont rapporté que la capacité antioxydante était plus élevée dans les jus commerciaux produits à partir de grenades Wonderful récoltées en Californie que celles obtenues en laboratoire en pressant les arilles à la main et ils ont suggéré que la punicalagine provenant des écorces est l'un des principaux composés phytochimiques contribuant à la capacité antioxydante totale du jus de grenade.

Différentes études ont indiqué que le pouvoir antioxydant est lié au développement des réductones. Ces derniers seraient des terminateurs des réactions en chaîne de radicaux libres (**Dorman et al., 2003 ; Shon et al., 2003 ; Duan et al., 2006**)

L'action antioxydante de ces réductones est basée sur la rupture des chaînes de radicaux libres par donation d'atome d'hydrogène en le convertissant ainsi en une espèce non-réactive plus stable. Les réductones réagissent avec certains précurseurs de peroxydes, empêchant ainsi la formation de peroxyde (**Negi et Jayaparkasha, 2003 ; Huang et Prior, 2005 ; Zhang et al., 2009**)

Selon **Jayaparkasha et al. (2003)** indiquent que l'effet réducteur des extraits de grenade semble être dû à la présence des polyphénols qui peuvent agir d'une manière similaire que les réductones par donation d'électrons.

En outre, les résultats du test de décoloration β -carotène ont montré que du le pourcentage d'inhibition est proportionnel à la concentration et que tous les extraits de la plante (*Punica granatum*) ont inhibé le blanchiment du β -carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libres. Cependant, l'activité antioxydante du jus de fruit (JPG) et de l'extrait méthanolique de l'écorce (EM) est plus élevée que le BHA.

Zaki et al. (2015) rapportent que les pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et méthanolique de l'écorce de grenade et du BHA ont augmenté avec la concentration croissante des extraits. A des concentrations de 100 $\mu\text{g/ml}$, les valeurs pour les extraits aqueux et méthanolique de la variété Manfalouty ont atteint 45,5 et 80,21%, et pour celles des extraits de la variété Wardey, 35,61 et 70,87% respectivement par rapport à celle de BHA (97,5%). Ils indiquent également que les extraits méthanoliques d'écorces des deux variétés de grenade étudiées ont montré des activités antioxydantes plus fortes que les extraits aqueux. Ceci pourrait s'expliquer par leurs teneurs phénoliques totales plus élevées.

Selon **Frankel et al. (1994)**, le test de blanchiment au β -carotène est similaire à une émulsion lipidique dans l'eau; **Frankel et Meyer (2000)** ont suggéré que les antioxydants qui présentent des propriétés apolaires sont les plus importants parce qu'ils sont concentrés dans l'interface lipide-eau, empêchant ainsi la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires sont dilués dans la phase aqueuse et sont donc moins efficaces pour protéger les lipides. Il a été constaté que les extraits d'éthanol constituant une quantité plus élevée de fraction lipophile présentaient une activité antioxydante supérieure à celles des extraits aqueux, constituant une plus grande quantité de fraction hydrophile (**Frankel et Meyer, 2000**). Ainsi, l'activité antioxydante des extraits est basée sur les adduits radicaux des extraits avec des radicaux libres de l'acide linoléique. Le radical libre de linoléate attaque les modèles de β -carotène insaturés. La présence des différents antioxydants peut nuire à l'importance du blanchiment du β -carotène en neutralisant le radical libre de linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système (**Jayaprakasha et al., 2001**).

De plus, **Ferreira et al. (2006)** ont remarqué que le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplé à celui du β -carotène, apparaît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques.

La réduction du niveau de peroxyde indique la capacité de la plante à minimiser les dommages oxydants à quelques tissus vitaux dans le corps parce que la peroxydation des lipides dans les systèmes biologiques a été longtemps considérée pour être un phénomène

toxicologique qui peut conduire à de diverses conséquences pathologiques (**Aiyegoro et Okoh, 2009**).

L'étude actuelle a prouvé que le fruit de *Punica granatum* dans son intégralité est une source riche d'antioxydants alimentaires.

Chapitre II.

Etude de l'activité anti-inflammatoire in vivo

II.2. Matériel animal

Nous avons travaillé sur des souris provenant de l'animalerie du laboratoire de Pharmacologie-toxicologie du Centre de Recherche et de Développement (CRD) - Sidal, il s'agit de 138 souris albinos de souche NMRI de poids moyen 25g, pour l'étude de la toxicité aiguë et de l'effet anti-inflammatoire.

Les animaux sont hébergés dans des cages solides en plastique. Ils sont acclimatés aux conditions de l'animalerie suivantes :

- Une température moyenne variante de 20°C à 25° C.
- Une photopériode de 12 heures/ 12 heures.
- Une humidité relative de 50%.

Ils disposent d'eau du robinet *ad libitum* et d'une alimentation granulée « O.N.A.B ». La *composition* du régime standard qui a servi à l'alimentation des souris est donnée dans l'**annexe II**.

II.2.1 Etude de la toxicité aiguë

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité.

II.2.1.1. Test de la dose limite

Le test de toxicité aiguë des extraits a été réalisé selon la méthode décrite par l'Organisation de la coopération Economique et Développement **OECD (2008), Essai n°425**.

Ce test est réalisé sur un effectif de 15 souris mâles pesant (25±5g), répartis en trois lots de 5 souris et maintenus à jeun 18 heures avant le début de chaque expérimentation. Nous avons administré :

- ∞ **Lot 1** : L'extrait méthanolique à la dose mère de 2000 mg/kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0.9%.
- ∞ **Lot 2** : L'extrait aqueux à la dose mère de 2000 mg/kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0.9%
- ∞ **Lot 3** : Le jus brut de *Punica granatum* à la dose mère de 2000mg/kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0.9%.

Nous avons administré 0.5 ml de chaque extrait aux souris par gavage à l'aide d'une sonde gastrique (**Figure 16**).

Les souris sont privées de nourriture mais pas d'eau, pendant 2 heures après l'administration. Elles sont observées individuellement dès les 30 premières minutes suivant l'administration et régulièrement durant les premières 24 heures, puis quotidiennement par la suite, la période d'observation totalisant 14 jours, pour toute manifestation anormale, hyperactivité, convulsion et mortalité (**Chan et Hayes, 1994**).

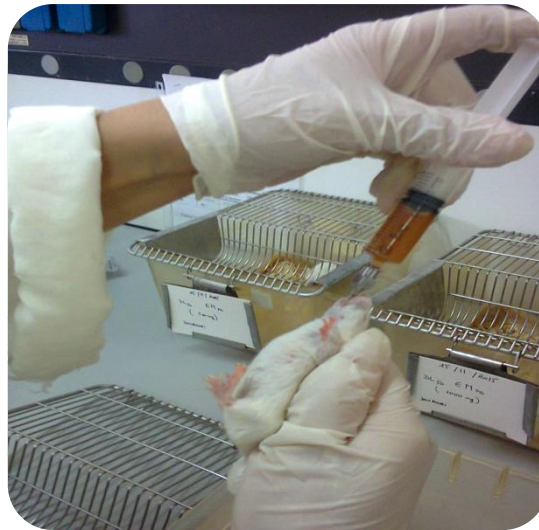


Figure 16: Administration des doses aux souris par gavage.

II.2.1.2. Test de toxicité aigue des extraits à différentes concentrations/doses

Le test a été réalisé sur un effectif de 75 souris réparties en cinq lots pour chaque extrait. Nous avons utilisé des lots de 5 souris, auxquels nous avons administré des doses de 300, 500, 1000, 1500, 2000 mg/kg des solutions tests à savoir l'extrait méthanolique (EM), l'extrait aqueux (EA) et le jus de fruit (JPG).

II.2.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire des extraits d'une plante médicinale, un modèle expérimental d'inflammation aigue de la patte de la souris induit par la carragène a été sélectionné.

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit de référence et du produit anti-inflammatoire à tester.

II.2.2.1. Prétraitement par les extraits

Une heure avant l'injection de la carragénine, des souris pesant (25 ± 5 g) sont réparties en 8 lots (n=6), à savoir sept lots traités et un lot témoin. Les souris ont été mises à jeun pendant 18h avant l'expérimentation.

Le gavage a été réalisé à l'aide d'une sonde gastrique.

- **Lot témoin** : reçoit par voie orale une solution de NaCl (0.9%) sous un volume de 0.5 ml.
- **Lot standard** : reçoit par voie orale 0.5 ml d'un produit anti-inflammatoire (Diclofénac® à 50mg/kg dissous dans du NaCl 0.9%);

∞ **Six lots traités avec les extraits de *Punica granatum* L. :**

- **Lot EM 1(n=6)**: reçoit 0.5 ml d'extrait méthanolique de *P. granatum* à une dose de 250 mg/kg de p.c dissous dans du NaCl 0.9%
- **Lot EM 2 (n=6)**: reçoit 0.5 ml d'extrait méthanolique de *P. granatum* à une dose de 500 mg/kg de p.c dissous dans du NaCl 0.9%
- **Lot EA 1 (n=6)**: reçoit 0.5 ml d'extrait aqueux de *P. granatum* à une dose 250 mg/kg de p.c dissous dans du NaCl 0.9%
- **Lot EA 2 (n=6)**: reçoit 0.5 ml d'extrait aqueux de *P. granatum* à une dose de 500 mg/kg de p.c dissous dans du NaCl 0.9%
- **Lot JPG 1 (n=6)**: reçoit 0.5 ml de jus frais de *P. granatum* à une dose de 250mg/kg de p.c dissous dans du NaCl 0.9%.
- **Lot JPG 2 (n=6)**: reçoit 0.5 ml de jus frais de *P. granatum* à une dose de 500mg/kg de p.c dissous dans du NaCl 0.9%.

(Wang et al., 2014 ; Baiju et al., 2015)

II.2.2.2. Induction de l'inflammation

Des œdèmes au niveau des pattes des souris sont induits après injection sub-plantaire (intra-articulaire) d'une solution de carragénine au niveau de la patte arrière droite, une heure après l'administration de l'extrait par voie orale. L'inflammation causée sera diminuée en présence de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire (Winter et al., 1962).

II.2.2.3. Injection de la carraghénine

Une heure après l'administration des traitements, chaque animal reçoit par voie sub-plantaire dans la patte arrière droite, 50 μ l d'une suspension de carraghénine à 1% dans du soluté physiologique (NaCl 0.9%).

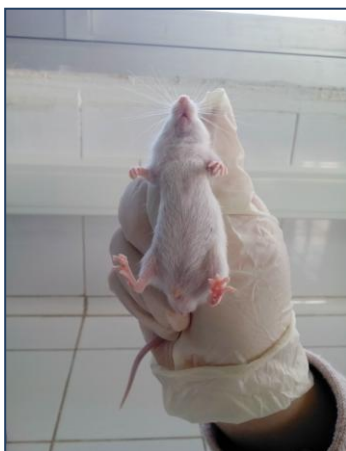


Figure 17 : Injection sub-plantaire de la carraghénine

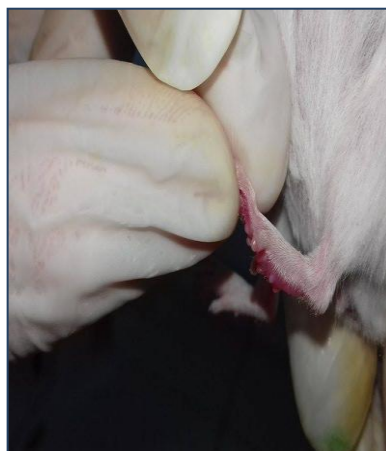
II.2.2.4. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

➤ Mesure de l'œdème

Le diamètre de la patte a été mesuré, à l'aide d'un pied de coulisse digital avant et après induction de l'œdème à des intervalles d'une heure pendant six heures (**Figure 18**). L'évolution de l'œdème de la patte arrière droite a été déterminée à 1 h, 2 h, 3h, 4h, 5h et 6 h.



Patte avant l'injection



Patte après l'injection



Mesure du diamètre de la patte

Figure 18: Mesure du diamètre de gonflement de la patte à l'aide d'un pied de coulisse digital.

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

Le pourcentage d'augmentation (%AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris. Il est donné par la formule suivante (Marzocco et al., 2004) :

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

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

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

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

Le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante (Marzocco et al., 2004) :

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

a. Examen histologique

Les souris sont anesthésiées à l'éther, et les pattes sont prélevées puis fixés dans une solution de formole à 10% pour l'étude histologique.

II.2.3. Etude histologique

Cette étude est réalisée à la fin des expérimentations sur les tissus de pattes des souris, au niveau du service d'anatomie pathologie du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) de Beni-Messous, Alger.

L'étude histologique a été réalisée selon le protocole suivant :

a) Fixation :

Les pattes prélevées sont fixées avec du formol dilué à 10%.

b) Décalcification :

La dureté du tissu osseux nécessite un traitement à l'aide d'agents chimiques permettant de chélater le calcium. La décalcification facilite l'obtention de coupes fines exploitables d'un point de vue microscopique. Durant cette étape, les pattes sont introduites dans une solution de décalcifiant (980ml de l'eau distillée + 20 ml de l'acide nitrique), pendant trois heures.

c) Macroscopie :

- La réalisation de fragments pour chaque patte,
- Introduction de ces fragments dans des cassettes d'inclusion, les cassettes ont été marquées sur leur bord au crayon.

d) Circulation :

Introduction des cassettes dans un appareil de circulation ou de déshydratation durant 24heures en passant par 12 bacs comme suit :

- Bac 1 : formol à 10 % durant une heure et demi-heure,
- Bac 2 : éthanol à 50% durant une heure,
- Bac 3 : éthanol à 60° durant une heure,
- Bac 4 : éthanol à 70° durant une heure,
- Bac 5 : éthanol à 80° durant une heure,
- Bac 6 : éthanol à 90° durant une heure,
- Bac 7 : éthanol à 96° durant une heure,
- Bac 8 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 9 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 10 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 11 : paraffine liquide durant deux heures,
- Bac 12 : paraffine liquide durant deux heures.

e) Inclusion et enrobage :

Le raffinage a lieu grâce à un appareil muni d'un compartiment alimenté en chaleur pour couler la paraffine (56°C – 58°C), et d'une plaque de refroidissante sur laquelle est mis un métallique contenant les cassettes où les pièces sont mises. Une fois les pièces de paraffine

liquide, elles sont laissées refroidir sur une plaque à froid. Ainsi, on obtient les blocs qui seront utilisés pour donner de fines coupes. Les blocs sont conservés au froid jusqu'à la coupe des pièces.

f) Coupe :

Des coupes de 4μ sont réalisées à l'aide d'un microtome, le ruban fractionné est porté sur une lame en verre, la lame est mise sur une plaque chauffante pour permettre un bon étalement et éviter la formation des plis. Les lames sont marquées sur leur bord par un stylo à diamant. Ensuite elles sont mises dans un plateau et l'incubation est effectuée sous une température de (50°C - 56°C) pendant toute la nuit.

g) Coloration :

La coloration est réalisée dans un appareil spécifique avec de l'Hématoxyline Eosine pour les échantillons des pattes des souris.

Les échantillons sont traités par plusieurs produits et dans plusieurs bacs comme suit :

- 3 Bacs de xylène durant 5 minutes chacune.
- 3 Bacs d'éthanol de concentration de 50° , 60° , 90° .
- 1 Bac d'eau distillée pendant 5 minutes
- 1 Bac d'hématoxyline d'Harris durant 8 minutes
- 1 Bac de solution de lavage, pour faire laver les lames pendant 5 minutes
- 1 Bac d'alcool-acide durant 3 secondes.
- 1 Bac de solution de lavage
- 1 Bac d'eau ammoniacale durant 15 secondes
- 1 Bac de solution de lavage durant 5 minutes
- 1 Bac d'Eosine durant 3 minutes suivi par un lavage pendant 5 minutes
- 3 Bacs d'éthanol de 5 minutes pour chacun
- 3 Bacs de xylène de 5 minutes pour chacun

h) Montage :

Une goutte d'une solution (EUKITT) est déposée permettant l'adhésion sur la lame, en présence d'une lame propre et sèche en inclinant progressivement cette dernière de façon que la solution s'étende peu à peu et recouvre la coupe sans emprisonner les bulles d'air. La lamelle est adhérente et la préparation est prête pour l'observation microscopique.

i) Lecture microscopique :

La lecture est réalisée par un photo-microscopique (Leica Microsystems) et chaque coupe est photographiée.

II.2.4. Etude statistique

Les résultats obtenues à partir de cette étude ont été analysés en utilisant le logiciel Statistica version 6.1 (StatSoft, Inc. USA, 2003). Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (S.E.M), et l'analyse statistique a été réalisée en utilisant l'analyse de variance à un facteur (ANOVA), suivie du test de Tukey.

II.2.5.4. Discussion

L'inflammation est principalement causée par la génération de radicaux libres. Par conséquent, l'administration d'antioxydants peut avoir un rôle protecteur dans ces conditions. La plupart des anti-inflammatoires agissent comme antioxydants et éliminent les radicaux libres générés au cours des processus inflammatoires (**Baret et al., 1984**).

Dans la présente étude, l'œdème de la patte induit par la carraghénine chez des souris a été utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vivo*, selon la méthode de **Winter et al. (1962)**. Nous avons utilisé le Diclofenac, un anti-inflammatoire non stéroïdien commun (AINS) comme témoin positif. Les souris ont été traitées avec les extraits d'écorces (EM et EA) et le jus brut frais du fruit du grenadier (250 et 500 mg/kg p.c) ou avec le Diclofenac (50 mg/kg) 1 heure avant l'induction de la carraghénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite de la souris.

L'œdème est évalué par la mesure du diamètre (mm) de la patte dans l'axe dorsal-plantaire avant et à des intervalles d'une heure, pendant 6 heures après injection de la carraghénine.

La carraghénine, est un produit naturel dérivé d'algues rouges appartenant à une famille de polysaccharides sulfatés linéaires. L'injection sous cutanée de la carraghénine conduit au développement d'une réponse inflammatoire (locale) caractérisée par les cinq signes cardinaux bien connus ; gonflement, rougeur, chaleur, perte de fonction et une hypersensibilité locale (**Winter et al., 1962 ; Nantel et al., 1999, Meira et al., 2014**). L'œdème de la patte induite par la carraghénine est un modèle standard d'inflammation aiguë accepté comme un outil phlogistique utile pour l'étude de nouveaux médicaments anti-inflammatoires (**Yin et al., 2000 ; Ziyang et al., 2007**). Des études antérieures ont indiqué que la réponse inflammatoire induite par la carraghénine est médiée par de multiples mécanismes tels que la libération d'eicosanoïdes, de cytokines, de chimiokines, de produits dérivés de mastocytes, de neuropeptides, de facteurs de transcription et d'implication de la migration des neutrophiles (**Patil et Patil, 2017**).

Il a été établi également que l'œdème de la patte induit par l'injection sous-plantaire de la carraghénine est un événement biphasique. L'œdème est causé par la sécrétion de 5-hydroxytryptamine (5-HT) au cours de la première heure, suivie par des kinines pour augmenter la perméabilité vasculaire jusqu'à deux heures et demie. Cette phase précoce est associée à la libération des médiateurs d'histamine, de sérotonine et de bradykinine. Ces changements hémodynamiques atteignent un niveau accru à la troisième heure après l'injection de la carraghénine et qui diminuent par la suite (**Alam et al., 2011 ; Sharififar et**

al., 2012). Tandis que la phase tardive se produit en 1 heure et dure 3 heures ou plus, elle est caractérisée par l'infiltration de leucocytes et médiée uniquement par les prostaglandines (**Vinegar et al., 1969 ; Posadas et al., 2004 ; Wang et al., 2010**). La plupart de ces médiateurs augmentent la perméabilité microvasculaire, ils agissent également comme des vasodilatateurs et réduisent la résistance artériolaire. En conséquence, la pression capillaire est élevée, ce qui augmente encore la pression nette de la filtration (**Scallan et al., 2010**). L'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui à son tour comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (**Mansour, 2015**).

L'œdème est une caractéristique commune de la réponse inflammatoire cutanée et dépend d'une synergie entre les médiateurs de la perméabilité vasculaire et le flux sanguin (**Clark, 2013**). Une conséquence importante de l'altération de la perméabilité capillaire dans l'inflammation locale est l'extravasation des leucocytes (**Muller, 2013**). Le degré d'accumulation de ces cellules dans les sites inflammatoires de la peau est lié au flux sanguin local.

Au cours du suivi des souris témoins et des souris traitées pendant les six heures après l'injection de la carragénine nous avons noté une augmentation du volume de la patte des souris de tous les lots dès la première heure de l'expérimentation. Cependant, l'inflammation est plus accentuée chez le lot témoin qui n'a reçu aucun traitement. Prouvant ainsi que la carragénine a bien induit une réaction inflammatoire engendrant un œdème.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Zhu et al. (2011)** où le volume d'œdème après injection de la carragénine augmente avec le temps jusqu'à atteindre son niveau maximal à la troisième heure. Comme expliqué ci-dessus, le développement oedémateux peut être divisé en deux phases:

Dans le groupe témoin, de 0 à 3 heures, l'œdème provoqué par l'agent phlogistique augmente progressivement et atteint un maximum à 3 heures (103.60 %). De 3 à 6h: alors que le volume de la patte dans le groupe témoin reste relativement inchangé, les changements de volume de la patte dans les autres groupes expérimentaux entrent dans une période de déclin, avec une diminution qui démarque le lot standard des autres. Cette diminution du pouvoir inflammatoire de la carragénine serait attribuée au pouvoir anti-inflammatoire du Diclofenac®, un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien.

Les AINS agissent en inhibant la cyclooxygénase (COX), ce qui inhibe la synthèse des prostaglandines, ce qui confère à cette classe de médicaments ses propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (**Pereira-Leite et al., 2016**). Les AINS peuvent être classés comme non sélectifs (inhibant à la fois COX-1 et COX-2) ou inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (célecoxib, étoricoxib, meloxicam et parécoxib). Sachant toutefois que la plupart des anti-inflammatoires sont cliniquement efficaces dans la deuxième phase de l'inflammation (**Olajide et al., 2000 ; Mehmood et al., 2016**).

Dans la présente étude, nous avons montré que l'extrait méthanolique dans les deux doses (250 et 500 mg/kg p.c) produisait des effets anti-inflammatoires causant une réduction très significative de l'œdème de la patte de souris induite par la carraghénine en fonction de la dose. On note également qu'après 3heures, les deux doses (250 et 500mg/kg) ont présenté une réduction importante du volume de la patte de 64.08 % et 69.69 % respectivement, comparé au groupe traité par le Diclofénac (49.13 %).

Baiju et ses collaborateurs (2015), ont découvert que l'extrait méthanolique inhibait de manière significative la formation d'œdèmes de manière dose-dépendante. La dose de 500 mg.kg⁻¹ p.c, montrait un effet inhibiteur de 70.7 % pour le modèle induit par la carraghénine sur la formation d'œdème. Dans la même étude, ils ont révélé que l'extrait méthanolique de l'écorce de fruit de *P. granatum* montrait une puissante activité dans le piégeage du superoxyde, hydroxyle et l'oxyde nitrique in vitro. Il a été rapporté par ailleurs que l'administration de l'extrait méthanolique augmente les niveaux de superoxyde dismutase, de catalase et de GSH dans les groupes traités par l'aspirine et l'éthanol induit par l'ulcère (**Ajaikumar et al., 2003**).

En outre, nos résultats rejoignent ceux de **Labib et El-Ahmady (2015)** qui indiquent que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique (200 mg/Kg p.c) avait diminué de manière similaire au groupe recevant le produit de référence d'Indométacine (20 mg /kg p.c) après 1h. Après 2 heures, le groupe traité avec l'EM (200mg/kg) a présenté une diminution importante du volume d'œdème de 53,3%, ce qui était considérablement plus élevé que celui résultant de l'administration d'Indométacine (44,86%).

Lee et al. (2010) ont démontré la capacité des extraits de grenade à inhiber la production de NO par les cellules de macrophage RAW 264.7. En outre, ils ont également constaté que l'extrait de grenadier (100 mg / Kg) a diminué de façon significative l'œdème de la patte de la

souris induite par la carraghénine pendant plusieurs heures (5 h au maximum). En même temps, les auteurs en utilisant une chromatographie sur colonne combinée à un fractionnement guidé par bioessai *in vitro* ont trouvé que la punicalagine, la punicaline, la strictinine A et la granatine B étaient capables d'inhiber la production de NO ainsi que l'expression iNOS dans des cellules RAW 264.7. La granatine B était celle qui présentait les effets inhibiteurs de l'iNOS et de la COX-2 les plus forts et présentait ces effets dans l'inhibition du gonflement de la patte et du taux de PGE2 chez les souris induites par la carraghénine. Selon ces résultats, les auteurs ont proposé que la granatine B puisse être utilisée comme marqueur standard de l'effet anti-inflammatoire du grenadier (**Lee et al., 2010**).

Dans un second temps, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux d'écorce de *Punica granatum* s'est révélée plus actif de la troisième jusqu'à la sixième heure (30.93 % et 63.86 %, respectivement) à une dose de 250 mg/Kg de p.c.

Selon **Wang et al. (2014)**, l'APG (extrait aqueux de *Punica granatum*) (500 -1000 mg /kg) inhibait le développement de l'œdème à 4-5 h après le traitement par la carraghénine. Pour l'APG à la dose de 1000 mg/kg p.c, les niveaux de volume d'œdème ont été abaissés à 61,0% de ceux observés dans le groupe témoin après 5 h de traitement. Ces données impliquent que l'APG peut agir comme un inhibiteur dans les processus inflammatoires aigus *in vivo*.

Comme mentionné ci-dessus, la réponse inflammatoire induite par la carraghénine a été liée à la production de radicaux libres, tels que les radicaux superoxyde et hydroxyle (**Mahjoub et al., 2010**). Cependant, ces espèces destructrices peuvent être contrôlées par des enzymes antioxydantes intracellulaires et des systèmes antioxydants non enzymatiques dans les tissus.

Bachoual et al. (2011) ont étudié l'effet de l'extrait aqueux d'écorces de grenade (PPAE) sur la production d'espèces réactives d'oxygène neutrophiles humaines (ROS) *in vitro* et sur l'inflammation pulmonaire induite par LPS *in vivo* chez la souris. La PPAE, de manière dépendante de la concentration, a inhibé la chimioluminescence amplifiée par luminol des neutrophiles en repos et des neutrophiles stimulés par l'acétate de myristate de phorbol (PMA) et de N-formyl méthionylleucylphénylalanine (fMLF). Au contraire, il n'y avait aucun effet significatif sur la génération d'anions superoxyde, ce qui suggère qu'il n'inhibe pas directement l'activité NADPH oxydase ou les voies d'activation, ni ne recueille les anions superoxyde. Des études *in vivo* ont montré que la PPAE a également atténué l'inflammation

pulmonaire induite par le LPS chez la souris. En conséquence, la PPAE inhibe l'activité myéloperoxydase des neutrophiles et atténue l'inflammation pulmonaire induite par le LPS chez la souris.

D'autre part, ces résultats concordent avec plusieurs recherches qui montrent que l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Punica granatum* peut s'expliquer en partie par la présence dans le fruit des composés polyphénoliques comme les tanins hydrolysables et les flavonoïdes (**Zarfeshany et al., 2017**). Ces derniers sont des constituants bien connus des plantes anti-inflammatoires. Certains flavonoïdes ont montré une action inhibitrice dans divers modèles animaux d'inflammation. Par exemple, certains flavonoïdes ont été révélés pour inhiber les modèles animaux d'inflammation aiguë: œdème de la patte, œdème de l'oreille et pleurésie (**Kim et al., 2017**). Quant à la majorité des tanins hydrolysables présents dans les grenades ; les gallotannins, l'acide ellagique et les tanins gallagylques, généralement appelés punicalagines ; ont montré un effet inhibiteur sur la prolifération de cellules cancéreuses humaines et moduler les voies de signalisation subcellulaires inflammatoires en raison d'une activité antioxydante élevée (**Seeram et al. , 2005**).

Dans ce même contexte, de nombreux travaux de recherches suggèrent que les parties végétales, qui contiennent des tanins, des alcaloïdes, des flavonoïdes et des acides phénoliques, possèdent des effets analgésiques et anti-inflammatoires sur des animaux expérimentaux et ces effets pharmacologiques sont obtenus à partir de ces contenus (**Mills et Bone, 2000; Morteza-Semnani et al., 2006**). Ajoutant à cela, l'étude phytochimique menée dans cette étude montrant la présence de plusieurs composés bioactifs qui pourraient confirmer l'activité anti-inflammatoire des extraits d'écorces de *Punica granatum*.

En dernier lieu, le jus de fruit de *Punica granatum* à la dose de 500 mg/kg réduit de façon hautement significative l'œdème induit par la carragénine de la 3^{ème} heure (39.72%) jusqu'à la 6^{ème} heure (74.66%). L'inhibition de l'œdème par le jus brut de *Punica granatum* à la dose de 500 mg/kg est comparable, à celle du Diclofenac. Cet effet anti-inflammatoire serait attribué à la présence des composés phénoliques tels que les tanins hydrolysables, les flavonoïdes, les anthocyanes ; identifiés et quantifiés précédemment lors de l'étude phytochimique.

L'ellagitanin est un type de tanins qui peut être décomposé en acide hydroxybenzoïque tel que l'acide ellagique. Il est largement utilisé dans les chirurgies plastiques, ce qui empêche la mort du volet cutané en raison de son activité antioxydante. Deux autres ellagitannins qui se trouvent dans le jus de grenade et l'écorce sont punicalagin et punicalin.

Rogério et al., (2006) ont examiné les effets anti-inflammatoires et antinociceptifs de l'acide ellagique dans un modèle animal. Leurs résultats suggèrent que l'acide ellagique diminue significativement l'œdème de la patte mesuré par un pied à coulisse après une injection de 1% de carraghénine et diminue le nombre de périodes de contorsion provoquées par l'acide. Ces périodes d'induction de la rétention peuvent provenir de l'inhibition de la COX ou d'une autre voie anti-nociceptive.

En outre, plusieurs classes de flavonoïdes de grenade comprennent des anthocyanines, des flavan 3-ol et des flavonols. Le jus et l'écorce de grenade contiennent également de la catéchine qui présente une activité antioxydante élevée. Ce sont des composés essentiels à la production d'anthocyanine avec un rôle antioxydant et anti-inflammatoire.

Tandis que les anthocyanes qui sont à l'origine de la couleur rouge du jus, ne se trouvent pas dans l'écorce. Tous les flavonoïdes de grenade présentent une activité antioxydante avec inhibition indirecte des marqueurs inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (**Newman et Lansky, 2007**)

Par ailleurs, l'inhibition de la COX par des anti-inflammatoires non stéroïdiens conventionnels (AINS) peut nuire à la fonction cardiovasculaire en raison de la suppression de la PGI2 (prostacycline), un prostanoloïde nécessaire à l'homéostasie cardiovasculaire qui empêche l'agrégation plaquettaire, régler l'expression de l'adhésion des cellules endothéliales Molécules (**Grosser et al., 2006**). Fait intéressant, le contraire semble vrai pour le jus de grenade (PJ). Comparé au jus d'orange, au jus de raisin pourpre (PGJ) et au café, PJ a favorisé le plus fortement l'expression de PGI2 chez des sujets humains 20 min et six heures après consommation, Bien que la PGJ favorise plus fortement l'expression de la PGI2 deux heures après la consommation, mais seule la PJ favorise la synthèse de la PGI2 dans les cellules endothéliales de l'aorte humaine (HAEC) in vitro (**Polagruto et al., 2003**).

Dans la présente étude, les extraits d'écorces et du jus brut du fruit de *P. granatum* dans les deux doses ont produit un effet anti-œdémateux significatif sur l'œdème de la patte induit par la carraghénine. Les doses les plus élevées des extraits ont montré un meilleur effet anti-inflammatoire. Ils sont efficaces après la première heure, suggérant ainsi que les extraits (EM, EA et JPG) inhibent la seconde phase de l'inflammation induite par la carraghénine.

Par ailleurs, l'administration de ces extraits d'écorces et du Jus de fruit de grenade ont présenté une inhibition de l'inflammation proche de l'effet inhibiteur du Diclofenac de

manière dose-dépendante. Cela suggère que le fruit de *Punica granatum* dans sa totale globalité a le potentiel d'inhiber l'inflammation aigue.

Il a été trouvé que la grenade et les constituants chimiques sélectionnés et isolés à partir de jus, d'écorce et de graines ont une large gamme d'effets: **(I)** l'inhibition de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et finalement la biosynthèse des eicosanoïdes (**Schubert et al., 1999 ; Shukla et al., 2008**) ; **(II)** la suppression synergique de l'expression d'une cytokine inflammatoire (**Adams et al., 2006**); **(III)** l'inhibition des MMP de matrice (**Okamoto et al., 2004 ; Ahmad et al., 2005 ; Aslam et al.,2006**)

Sur la base de ces rapports, on peut déduire que l'effet inhibiteur des extraits de *Punica granatum* sur l'inflammation induite par la carraghénine peut être dû à l'inhibition des médiateurs responsables de l'inflammation.

Par conséquent, la présente étude a prouvé que l'activité anti-inflammatoire de l'écorce et du jus de fruit de *P. granatum* peut être due à ses puissantes propriétés antioxydantes. En conclusion, les résultats de notre étude fournissent une base scientifique pour l'utilisation traditionnelle des extraits de *P. granatum* pour la gestion des douleurs inflammatoires. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires pour isoler le principe actif et comprendre le mécanisme d'action correct du composé.

Chapitre III.

Etude de l'activité antioxydante
in vivo

II.3. Matériel animal

Un effectif de 45 rats Wistar mâles de poids corporel entre (150-200 g) ont été regroupés et logés dans des cages de cinq animaux par cage et maintenus dans des conditions de laboratoire standard avec cycle d'obscurité et de la lumière. Ils ont libre accès à l'alimentation et l'eau *ad libitum*.

II.3.1. Répartition des rats

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'écorces et du jus brut du fruit de *Punica granatum* est déterminée par la méthode expérimentale de **Pirinccioglu et al. (2012)**.

Les rats ont été répartis en huit groupes de cinq rats chacun. Les groupes ont été désignés comme suit :

- **Groupe I:** Rats témoin,
- **Groupe II:** Rats traités avec le CCl₄,
- **Groupe III:** Rats traités par l'UDCA + CCl₄,
- **Groupe IV:** Rats traités par jus brut (JPG) + CCl₄,
- **Groupe V :** Rats traités par l'extrait méthanolique (250mg /kg) + CCl₄,
- **Groupe VI :** Rats traités par l'extrait méthanolique (500mg/kg) + CCl₄,
- **Groupe VII :** Rats traités par l'extrait aqueux (250 mg/kg) + CCl₄,
- **Groupe VIII :** Rats traités par l'extrait aqueux (500 mg/kg) + CCl₄.

Le poids corporel a été mesuré chaque semaine.

II.3.2. Induction de l'intoxication

Le tétrachlorure de carbone est utilisé pour l'induction de l'intoxication. L'huile d'olive est utilisée pour préparer la solution d'intoxication (1:1, v/v).

Par ailleurs, l'Ursolvan® (200mg) est utilisé comme produit de référence ; la substance active est l'acide ursodésoxycholique (UDCA).

II.3.3 Prétraitement par les extraits

Avant l'entame de l'expérimentation, les rats ont été mis à jeun pendant 18h. Le gavage a été réalisé à l'aide d'une sonde gastrique (**Figure 38**).

∞ Lot non traité

- **Groupe I (Contrôle normal)** : reçoit par voie orale une solution de 2ml de NaCl (0.9%).

∞ Lots traités :

Les groupes III et IV, V, VI, VII, VIII ont été traités avec du CCl₄ (1:1 dans de l'huile d'olive) à raison de 1 ml/kg de poids corporel (Dose hebdomadaire).

- **Groupes II** : reçoit une dose journalière de CCl₄ à 0.1 ml/kg p.c (1:1 dilué dans de l'huile d'olive)
- **Groupe III** : reçoit par voie orale 2 ml du produit de référence UDCA (10mg/kg de poids corporel) dissous dans du NaCl 0.9%, chaque jour pendant 3 semaines, respectivement.
- **Groupe IV** : reçoit le jus brut frais du fruit de *P. granatum* (2 ml/kg de poids corporel, dose journalière)
- **Groupe V** : reçoit 2 ml d'extrait méthanolique de *P. granatum* à une dose de 250 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0.9% (Dose journalière)
- **Groupe VI** : reçoit 2 ml d'extrait méthanolique de *P. granatum* à une dose de 500 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0.9% (Dose journalière)
- **Groupe VII** : reçoit 2 ml d'extrait aqueux de *P. granatum* à une dose de 250 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0.9%
- **Groupe VIII** : reçoit 2 ml d'extrait aqueux de *P. granatum* à une dose de 500 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0.9%



Figure 38: Administration par voie orale des extraits aux rats à l'aide d'une sonde gastrique.

II.3.4. Prélèvements sanguins

A la fin de la 3^{ème} semaine de la période expérimentale, des prélèvements sanguins sont effectués chez les rats à jeun et sous anesthésie par l'éther diéthylique. Ils sont réalisés dans le jour même d'euthanasie à partir du sinus caverneux par le biais des tubes de micro-hématocrites (**Figure 39**). Au cours de chaque prélèvement, 2 à 3 ml de sang sont recueillis dans deux différents types de tubes contenant des anticoagulants (héparine, EDTA), ensuite les tubes héparinés sont centrifugés à 2000 g (rpm) pendant 10 min, et le sérum a été stocké à 4°C pour une analyse biochimique.



Figure 39 : Prélèvement sanguin à partir du sinus caverneux par le biais des tubes micro-hématocrites

II.3.5. Analyses biochimiques

Les paramètres suivants : l'aspartate aminotransférase sérique (AST), alanine aminotransférase (ALT), bilirubine totale (TB), phosphatase alcaline (PAL) ont été mesurés par des méthodes enzymatiques.

II.3.6. Procédure histologique

Après l'euthanasie des rats à la fin de l'expérimentation, leurs foies, reins et cerveaux sont soigneusement prélevés (**Figure 40**), examinés, rincés rapidement avec une solution de NaCl à 0.9% glacée. Les foies sont pesés et divisés en deux sections ; une section pour l'examen histologique et une autre qui servira pour la détermination de l'acide thiobarbiturique

(TBARS). Après l'exérèse, les échantillons d'organes sont conservés dans du formol à 10 % pour l'étude histologique.



Figure 40: Sacrifice et prélèvement des différents organes.

II.3.7. Détermination de l'acide thiobarbiturique (TBARS) réactive des substances dans les échantillons de tissus

Les échantillons de foie ont été homogénéisés avec 120 mM de KCl, 50 mM de tampon phosphate pH 7,4 (1/10, p / v).

Les homogénats ont été centrifugés à 700 g à 4°C pendant 10 minutes et le surnageant a été maintenu à $\pm 20^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

Le niveau du MDA des échantillons des tissus hépatiques a été mesuré par la méthode de réaction de l'acide thiobarbiturique (TBARS). TBARS ont été déterminées par calorimétrie (**Draper et Hadley, 1990**).

En bref, 1 ml de chaque échantillon a été mélangé avec 1 ml de TCA à 10% et 1 ml de TBA 0.67%, puis on chauffe dans un bain d'eau bouillante pendant 15 min. Les tubes ont été refroidis sur de la glace, et le complexe triméthine de couleur rose a été extrait dans 3 ml de n-butanol.

La phase organique a été séparée par centrifugation pendant 10 min à 3000 g; MDA, un produit intermédiaire de la peroxydation lipidique a été déterminé par l'absorbance à 535 nm. Une courbe standard pour TBARS a été préparé avec 1,1,3,3 tétraméthoxypropane dans une plage de concentration de 0.1-10 nmol. Les résultats sont exprimés en nanomoles MDA par gramme de tissu.

II.3.8. Etude histologique

Cette étude est réalisée à la fin des expérimentations des tissus cérébraux, hépatiques et rénaux au niveau du service d'anatomie pathologie du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) de Beni Messous, Alger.

L'étude histologique a été réalisée selon le protocole suivant :

j) Fixation :

Les organes prélevés sont fixés avec du formol dilué à 10%.

k) Macroscopie :

- La réalisation de fragments pour chaque organe,
- Introduction de ces fragments dans des cassettes d'inclusion, les cassettes ont été marquées sur leur bord au crayon.

l) Circulation :

Introduction des cassettes dans un appareil de circulation ou de déshydratation durant 24heures en passant par 12 bacs comme suit :

- Bac 1 : formol à 10 % durant une heure et demi-heure,
- Bac 2 : éthanol à 50% durant une heure,
- Bac 3 : éthanol à 60° durant une heure,
- Bac 4 : éthanol à 70° durant une heure,
- Bac 5 : éthanol à 80° durant une heure,
- Bac 6 : éthanol à 90° durant une heure,
- Bac 7 : éthanol à 96° durant une heure,
- Bac 8 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 9 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 10 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 11 : paraffine liquide durant deux heures,
- Bac 12 : paraffine liquide durant deux heures.

m) Inclusion et enrobage :

Le raffinage a lieu grâce à un appareil muni d'un compartiment alimenté en chaleur pour couler la paraffine (56°C – 58°C), et d'une plaque de refroidissante sur laquelle est mis un métallic contenant les cassettes où les pièces sont mises. Une fois les pièces de paraffine liquide, elles sont laissées refroidir sur une plaque à froid. Ainsi, on obtient les blocs qui seront utilisés pour donner de fines coupes. Les blocs sont conservés au froid jusqu'à la coupe des pièces.

n) Coupe :

Des coupes de 4 μ sont réalisées à l'aide d'un microtome, le ruban fractionné est porté sur une lame en verre, la lame est mise sur une plaque chauffante pour permettre un bon étalement et éviter la formation des plis. Les lames sont marquées sur leur bord par un stylo à diamant. Ensuite elles sont mises dans un plateau et l'incubation est effectuée sous une température de (50°C- 56°C) pendant toute la nuit.

o) Coloration :

Deux types de colorations sont nécessaires pour la réalisation de cette étape.

La coloration est réalisée dans un appareil spécifique avec de l'Hémathoxyline Eosine pour les échantillons du tissu cérébral et le trichrome de Masson pour colorer les échantillons de tissus de foie et de rein.

▪ Coloration à l'Hémathoxyline-éosine

Les échantillons sont traités par plusieurs produits et dans plusieurs bacs comme suit :

- 3 Bacs de xylène durant 5 minutes chacune.
- 3 Bacs d'éthanol de concentration de 50°, 60°, 90°.
- 1 Bac d'eau distillée pendant 5 minutes
- 1 Bac d'hémathoxyline d'Harris durant 8 minutes
- 1 Bac de solution de lavage, pour faire laver les lames pendant 5 minutes
- 1 Bac d'alcool-acide durant 3 secondes.
- 1 Bac de solution de lavage
- 1 Bac d'eau ammoniacale durant 15 secondes

- 1 Bac de solution de lavage durant 5minutes
- 1 Bac d'Eosine durant 3minutes suivi par un lavage pendant 5 minutes
- 3 Bacs d'éthanol de 5 minutes pour chacun
- 3 Bacs de xylène de 5 minutes pour chacun

▪ **Coloration de trichrome de Masson**

Les échantillons de foie et de rein sont traités par plusieurs produits et dans plusieurs bacs comme suit :

- 3 Bacs de xylène durant 5 minutes chacune.
- 3 Bacs d'éthanol de concentration de 50°, 60°, 90°.
- 1 Bac d'eau distillée pendant 5 minutes
- 1 Bac d'hématoxyline d'Harris durant 8minutes
- 1 Bac de solution de lavage, pour faire laver les lames pendant 5 minutes
- 1 Bac de fuchsine ponceau (dilué à 1 pour 5 dans de l'eau acétifiée) pendant 10 minutes.
- 1 Bac de solution de lavage à l'eau acétifiée pendant 5 minutes
- 1 Bac du colorant vert-lumière pendant 5 minutes suivi par un lavage pendant 5 minutes
- 3 Bacs d'éthanol de 5 minutes pour chacun
- 3 Bacs de xylène de 5 minutes pour chacun

p) Montage :

Une goutte d'une solution (EUKITT) est déposée permettant l'adhésion sur la lame, en présence d'une lame propre et sèche en inclinant progressivement cette dernière de façon que la solution s'étende peu à peu et recouvre la coupe sans emprisonner les bulles d'air. La lamelle est adhérente et la préparation est prête pour l'observation microscopique.

q) Lecture microscopique :

La lecture est réalisée par un photo-microscopique (Leica Microsystems) et chaque coupe est photographiée.

II.3.9. Etude statistique

Les valeurs des paramètres ont toutes été exprimées en moyenne \pm SEM. Les différences significatives entre les groupes ont été déterminées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA – One Way) en utilisant le logiciel Statistica version 6.1 (StatSoft, Inc. USA, 2003).

Les résultats ont été considérés comme significatifs si la valeur de P était $<0,01$.

II.3.10. Résultats

II.3.10.1. Evolution du poids corporel des rats normaux et expérimentaux

La figure 41 présente l'évolution des poids corporels des rats pendant la période expérimentale.

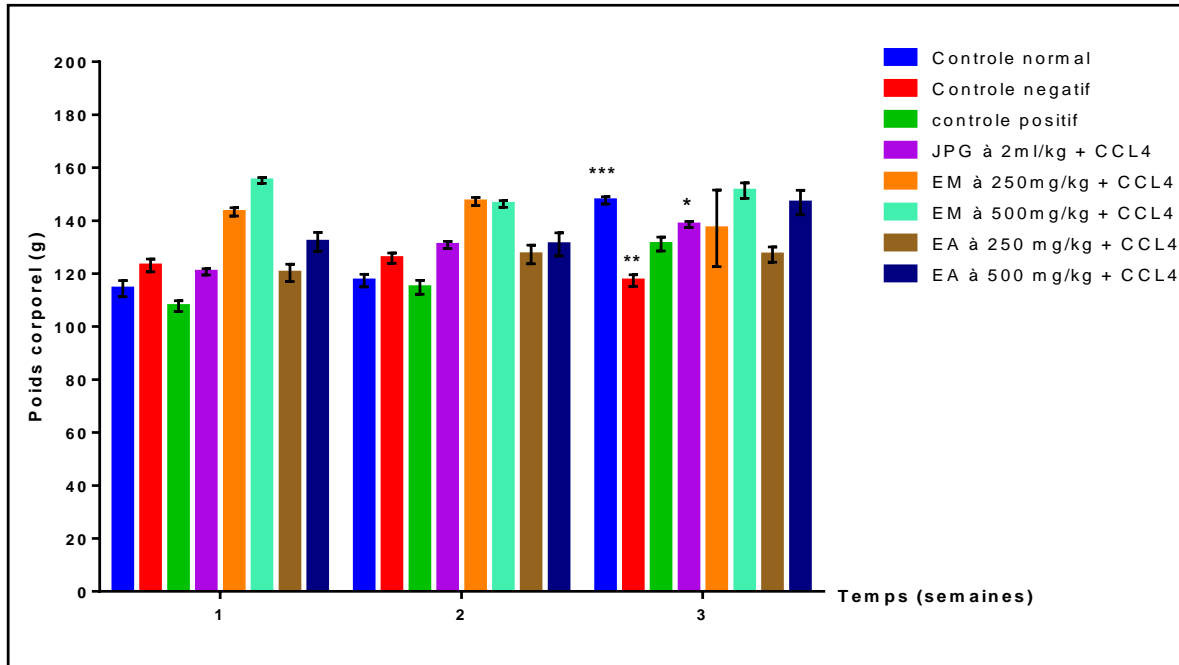


Figure 41: Evolution du poids corporel des animaux au cours de l'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 5 animaux par groupe. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ Significativement différent de la première semaine.

La **figure 41** représente l'évolution du poids corporel des animaux durant 20 jours (3 semaines) d'expérimentation. Il en ressort que les rats normaux (Contrôle normal) ayant reçu de l'eau physiologique uniquement, présentent une augmentation hautement significative du poids corporel durant la 3ème semaine par rapport à la 1ère semaine ($p < 0.0001$). Les valeurs moyennes du poids corporel étaient de l'ordre de : 114.34 g (1ère semaine) ; 117.35 (2ème semaine) et de 147.67g à la fin de cette étude (**Tableau 21, figure 41**).

Contrairement au contrôle normal, le poids corporel des rats du contrôle négatif traités avec du CCl₄ a connu des fluctuations au cours de l'expérimentation ou aucune différence très significative est observée entre la valeur moyenne du poids corporel en début d'expérimentation (123.09g) et en fin d'expérimentation (117.38g).

Chez les rats du contrôle positif traités avec le produit de référence l'UDCA (10mg/kg) et avec du CCl₄ à raison de 1 ml/kg de poids corporel, une dose hebdomadaire au cours des 3

semaines de l'expérimentation. Le poids corporel a continué à évoluer jusqu'à la fin de l'expérimentation ($p < 0.001$).

Toutefois, aucune différence significative n'est observée chez les rats traités par les extraits d'écorces (EM, EA), alors que pour le jus de fruit de *Punica granatum*, une différence significative est observée la dernière semaine.

En outre, l'étude statistique nous a permis de conclure en comparant les valeurs moyennes du poids corporel des rats traités avec les extraits du grenadier à celles des rats du contrôle normal, du contrôle négatif ainsi que les rats traités avec le produit de référence (UDCA, contrôle positif) ;

- Le lot traité par le jus de grenade n'a présenté aucune différence significative par rapport aux rats témoins et ceux traités par l'UDCA alors que leur poids corporel est significativement différent de celui du contrôle négatif à la troisième semaine ($p < 0.01$).

- Les groupes (VII, VIII) traités par l'extrait aqueux aux doses de 250mg/kg et 500mg/kg, une différence significative ($p < 0.01$) est observée par rapport au témoin à la 1^{ère} et 3^{ème} semaine, respectivement. Contrairement aux rats traités par l'EA à 250 mg/kg qui n'ont présenté aucune différence significative comparativement au contrôle positif et négatif, l'extrait aqueux à la dose de 500 mg/kg a présenté une différence hautement significative du début jusqu'à la fin de l'expérimentation.

- Cependant, les rats qui ont été traités avec l'extrait méthanolique à 500mg/kg ont montré d'une part, une différence hautement significative de la 1^{ère} à la 6^{ème} semaine de l'expérimentation comparativement aux groupes I et III ($p < 0.0001$). Alors qu'une différence significative est enregistrée à la 2^{ème} semaine de l'expérience ($p < 0.01$) et hautement significative en fin d'expérimentation ($p < 0.0001$) en comparaison avec le contrôle négatif.

- En outre, le groupe V traité avec l'extrait méthanolique (250mg/kg) une différence très significative est observée par rapport au contrôle négatif ($p < 0.001$) et hautement significative comparativement au poids corporel des rats traités par le produit de référence l'UDCA.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que le poids corporel des rats traités par les extraits de *Punica granatum* a continué évoluer au cours des trois semaines de l'expérimentation au même titre que les rats traités par le produit de référence l'UDCA.

II.3.10.2. Paramètres biochimiques

L'effet de l'intoxication sur les paramètres biochimiques (ALT, AST, BT, PAL) des rats normaux et expérimentaux est représenté dans le tableau (Annexe III).

Les activités enzymatiques d'ALT et de l'AST mesurées au niveau des sérums sanguin des rats normaux et expérimentaux sont reportées dans la figure 43.

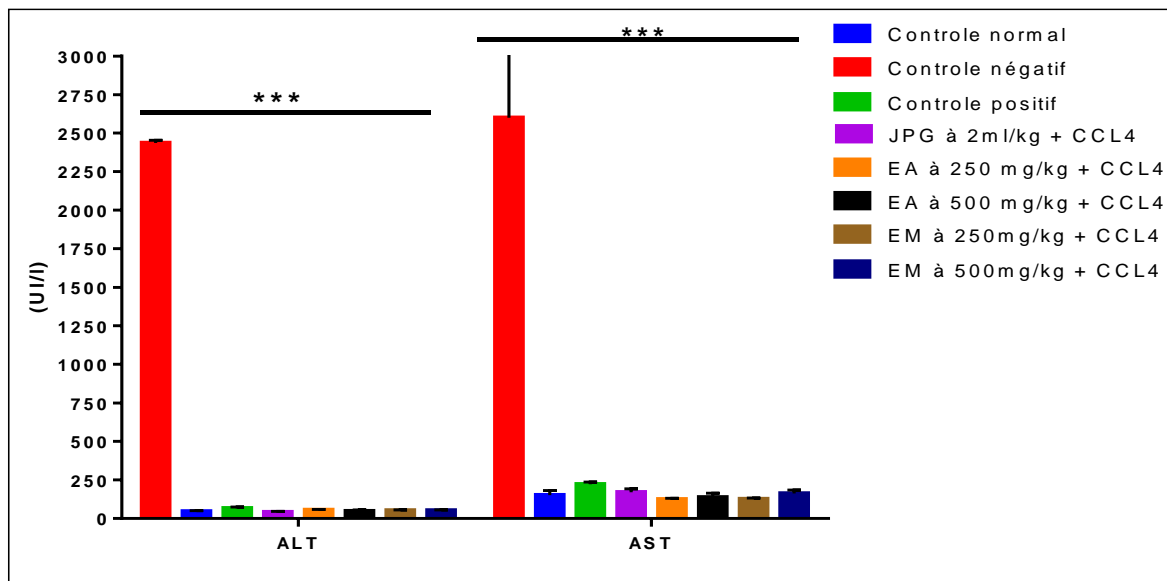


Figure 42: Dosage de l'Alanine aminotransférase et de l'Aspartate aminotransférase sérique.

Les valeurs sont données en moy±SEM (n=5).

Comparaison par rapport au groupe II ; (***, p<0.0001)

Les taux d'AST, d'ALT, du BT et du PAL ont été trouvés entre 151.66 ± 30.56 UI/l, 47 ± 4.49 UI/l, 2.08 ± 0.12 mg/dl et 0.79 ± 0.47 mg/dl chez les rats du contrôle normal (groupe I) (Tableau 22, annexe III), respectivement.

Les résultats montrent que l'administration du CCl_4 a considérablement augmenté les activités des taux d'AST et d'ALT dans le sérum du groupe II en comparaison avec les groupes I, III, IV, V, VI, VII, VIII. Une différence hautement significative est observée (p<0.0001).

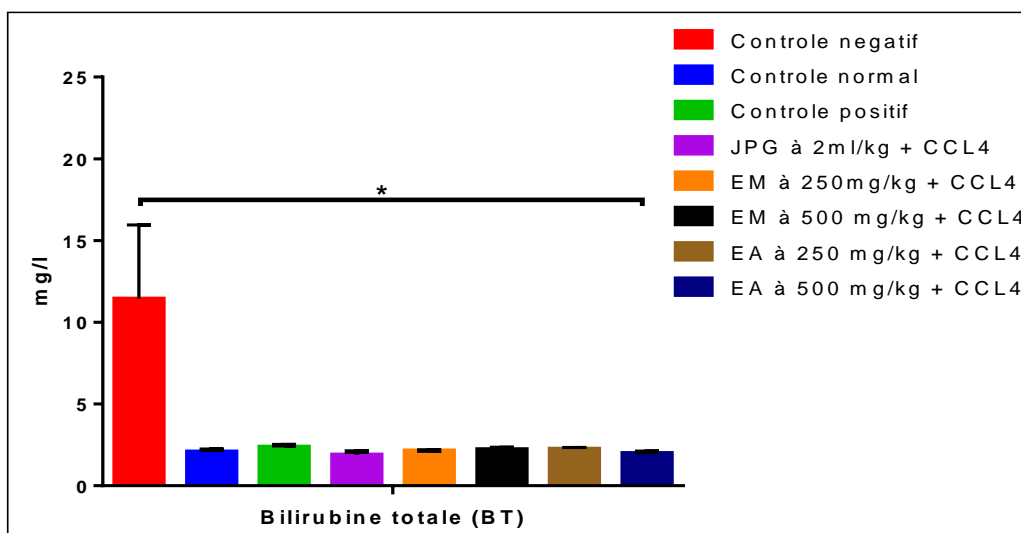


Figure 43: Dosage de la bilirubine totale dans le sérum des rats normaux et expérimentaux

Les valeurs sont données en moy±SEM (n=5).

Comparaison par rapport au groupe II ; (*, p<0.01)

Les taux de bilirubine total ont également augmenté de 2.08 ± 0.12 à 11.43 ± 7.86 mg/l chez les rats du groupe II. Cette augmentation était significativement plus élevée ($p < 0.01$) que les valeurs obtenues dans les autres groupes (groupes I, III, IV, V, VI, VII, VIII). L'effet du jus de grenade et des extraits d'écorces était comparable à celui de l'UDCA (produit de référence) dans tous les marqueurs enzymatiques testés.

A l'exception du taux de la phosphatase alcaline qui était plus élevée chez les rats traités par le jus de fruit (JPG à 2mg/kg, groupe IV) par rapport aux rats des groupes I, III, V, VI, VII, VIII. Les niveaux de PAL ont augmenté de 0.79 ± 0.47 UI/l à 144.67 ± 14.68 UI/l chez les rats du groupe IV. Le groupe I (Contrôle normal), groupe III (Contrôle positif) et le groupe VII (reçu l'extrait aqueux à 250mg/ml) n'ont pas montré tout changement important dans les niveaux de la phosphatase alcaline.

Toutefois, nous remarquons que les taux de la phosphatase alcaline ont diminué chez les rats des groupes V (reçu l'EM à 250mg/kg), groupe VI (reçu l'EM à 500mg/kg) et le groupe VIII (reçu l'EA à 500mg/kg). Les valeurs étaient de 0.04 ± 0.03 , 0.01 ± 0.003 et de 0.03 ± 0.01 UI/l, respectivement.

II.3.10.5. Discussion

Dans l'évaluation des dommages hépatiques par les hépatotoxines, le CCl₄ est l'un des plus utilisés dans l'étude expérimentale des maladies du foie. La toxicité au tétrachlorure de carbone CCl₄, qui est un toxique organochloré à tropisme essentiellement hépatique et dont le mécanisme d'action physiopathologique a été décrit par plusieurs auteurs, entre autres **Letteron et al. (1990)**, **Peter (2010)** et **Sarada et al. (2012)**, permet de mieux appréhender les dommages hépatiques dont il est responsable. En effet, la métabolisation hépatique du tétrachlorure de carbone (CCl₄) commence par sa transformation en ses métabolites primaires (trichlorométhyl (CCl₃) et trichlorométhylperoxyde (CCl₃O₂·)) grâce à la cytochrome P450 oxydase hépatique, principal système enzymatique responsable des réactions d'oxydoréduction des xénobiotiques au niveau du foie et des reins (**Singh et al., 1999 ; Sourabie et al., 2012 ; Pisoschi et Pop, 2015**).

Le trichlorométhylperoxyde est un radical libre hautement réactif qui va initier une lipoperoxydation (peroxydation lipidique) autrement dit l'oxydation des acides gras polyinsaturés des phosphomembranes lipidiques des hépatocytes (**Sourabie et al., 2012**).

Une conséquence de cette activité radicalaire est la désagrégation des membranes des hépatocytes dont les enzymes intra-cytoplasmiques entre autres les transaminases (AST/GOT et ALT/GPT) et la phosphatase alcaline (PAL) vont se déverser dans le milieu extracellulaire (plasma sanguin) ; toute chose entraînant une élévation significative des marqueurs sériques.

Les résultats de cette étude ont démontré que l'injection du CCl₄ à des rats induit de graves lésions hépatiques qui sont détectées en raison de l'augmentation des taux des enzymes sériques l'AST et l'ALT. **El-Khadragy (2011) ; Srivastava et Shivanandappa (2006) ; Abdel-Moneim et al. (2010)**, ont rapporté les mêmes constatations que l'administration du CCl₄ à des rats augmente considérablement les taux sériques d'AST, d'ALT, d'PAL, de GGT et de BT, reflétant ainsi la gravité des lésions hépatiques.

Les aminotransférases contribuent à un groupe d'enzymes qui catalysent l'interconversion des acides aminés et des α-cétocides par le transfert du groupe amino. Ce sont des enzymes spécifiques du foie et sont considérés comme des indices très sensibles et fiables pour les hépatotoxiques nécessaires ainsi que l'effet hépatoprotecteur ou curatif de divers composés.

D'autre part, les niveaux d'enzymes chez les rats traités par les extraits de grenade étaient à des niveaux proches de la normale. Ces résultats montrent que les extraits d'écorces (EM,

EA) et le jus (JPG) de grenade peuvent stabiliser les membranes des cellules hépatiques et empêcher la fuite des enzymes. Prévenir la production de radicaux libres et les neutraliser ainsi que le potentiel de protection de cette plante contre les hépatotoxines peut être attribué à son effet cicatrisant et ou régénérateur.

Par ailleurs, l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) sérique et de la bilirubine est également liée à la fonction de la cellule hépatique. La phosphatase alcaline est une enzyme glycoprotéique liée à la membrane avec une concentration élevée dans les sinusoides et l'endothélium. Cette enzyme atteint le foie principalement de l'os. Il est excrété dans la bile; par conséquent, son élévation dans le sérum se produit lors des maladies hépatobiliaires. Nos résultats utilisant le modèle d'hépatotoxicité induite par le CCl₄ chez les rats ont démontré que les extraits de *Punica granatum* diminuaient l'activité des taux sériques de la PAL et de la bilirubine totale. La stabilisation du taux de l'ALT, de la PAL et de la bilirubine totale par les extraits d'écorces aux doses 250 et 500mg/kg est un indicateur de l'amélioration de l'état fonctionnel du foie. A l'exception du groupe traité par le jus de grenade à raison de 2ml/kg ou nous remarquons une augmentation du taux de la phosphatase alcaline par rapport aux rats du contrôle négatif traités par le CCl₄.

Ces résultats sont également soutenus par l'étude histopathologique des tissus hépatiques et rénaux des différents groupes. Cependant, les échantillons du cerveau de tous les groupes ont montré une apparence normale. Il semblerait que le CCl₄ n'a pas traverser la barrière hémato-encéphalique. Des observations similaires ont été observées par **Pirinccioglu et al. (2012)**. Ces derniers ont constaté que la toxicité du CCl₄ dans le cerveau est relativement plus faible que dans le rein et le foie. Ceci est probablement dû à une dose limitée du CCl₄.

Plusieurs études ont été effectuées sur l'effet protecteur du jus de grenade contre l'intoxication au CCl₄ chez les rats entre autre les travaux menés par **El-Khadragy en (2011) et Pirinccioglu et al. en (2012)**. Les niveaux accrus des enzymes sériques ont été significativement diminués par le traitement avec du jus de fruit de *P. granatum*, ce qui implique que le jus a empêché les dommages au foie, ceci a été confirmé par la quantité réduite de lésions histopathologiques.

En effet, le jus a aboli les lésions induites par le CCl₄, cette hépatoprotection serait probablement attribuée à ses propriétés anti-inflammatoire et antioxydantes (et/ou scavenger) (**Gil et al., 2000 ; Zarfeshany et al., 2014**).

Le jus de grenade est riche en flavonoïdes connues par leurs pouvoirs anti-inflammatoires et antioxydants. Comme ils sont connus pour diminuer l'hépatotoxicité causée par les produits chimiques (xénobiotiques) et protègent contre les dommages causés par le stress oxydatif (**Olaleye et al., 2014**). Cet effet antioxydant du jus de grenade agit en arrêtant la formation du radical trichlorométhyle à partir du métabolisme du CCl_4 et que ce facteur de protection peut être dû à son action en tant que donneur d'électrons aux radicaux libres (**Prasetyastuti et al., 2017**).

La grenade présente une bonne capacité antioxydante et est un piège efficace pour plusieurs espèces réactives de l'oxygène, principalement en raison de sa teneur élevée en acides phénoliques, flavonoïdes et autres composés polyphénoliques (**Aviram et al., 2000**). Notre étude a montré également que le cultivar sélectionné Doux de Messaad pouvait être une source naturelle de composés phénoliques. Et que l'évaluation de l'activité antioxydante in vitro par l'utilisation de trois méthodes à savoir le piégeage du radical libre (DPPH), la réduction du fer (FRAP) et le blanchiment du β -carotène, a permis de démontrer que les extraits étudiés et/ou le fruit du grenadier sont dotés d'un excellent potentiel antioxydant.

Ces résultats sont en accord avec une étude menée par **Zhen et al. (2007)**, qui a montré que les composés polyphénoliques protègent de la cirrhose du foie induite par le CCl_4 . Selon d'autres recherches (**Li et al., 2011**), les effets protecteurs et antioxydants des extraits végétaux contenant des phénols contre les lésions hépatiques induites par le tétrachlorure de carbone étaient liés aux effets de piégeage des radicaux libres.

Le fruit du grenadier contient des composés précieux dans différentes parties du fruit dont les effets fonctionnels et médicinaux tels que les effets antioxydants, anticancéreux et antiathérosclérotiques ont été confirmés (**Perze-Vicente et al., 2002 ; Mertens-Talcott et al., 2006**). Dans une étude précédente, il a été rapporté que l'extrait méthanoïque de l'écorce de grenade possédait une activité antioxydante élevée dans divers modèles in vitro et in vivo (**Singh et al., 2002**). Les extraits d'écorces offrent également une protection contre la toxicité du CCl_4 (**Murthy et al., 2002 ; Khalil, 2004**).

En conclusion, les effets protecteurs de *P. granatum* sont présentés de multiples façons. *P. granatum* récupère les radicaux libres produits par le CCl_4 et augmente l'activité du système antioxydant-défense. Les actions de *P. granatum* ont une importance clinique significative, car l'abus d'alcool ou d'autres xénobiotiques endommagent le foie d'une manière similaire à ce

modèle d'intoxication par le CCl₄. D'autres études sur les composés antioxydants individuels isolés des extraits d'écorces ou du jus de grenade de *P. granatum* sur les hépatocytes doivent être menées, ce qui nous permettra de comprendre le mécanisme exact de l'action hépatoprotectrice de *P. granatum*.

Troisième partie

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne, nous nous sommes intéressés à l'évaluation phytothérapeutique, anti-inflammatoire et antioxydante du grenadier Algérien (*Punica granatum* L.). Notre choix s'est porté sur une variété locale le « Doux de Messaad », ou nous avons évalué in vivo les activités biologiques des extraits d'écorces et du jus de fruit.

Il ressort de ce travail de thèse des points essentiels à souligner :

La caractérisation chimique du jus de grenade a permis de révéler un taux de solubles solides important de l'ordre de 27.50 °Brix, une acidité titrable minimale (0.47%) et un pH de 4.12. L'indice de maturité a permis de classer le cultivar étudié parmi les cultivars doux.

L'étude phytochimique basée sur des tests préliminaires révèle que les différents extraits de l'épicarpe et le jus brut de *Punica granatum* sont riches en métabolites secondaires, notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les glycosides, les carbohydrates et les saponines.

L'étude des extraits d'écorces a montré des teneurs variées en polyphénols totaux et en tanins hydrolysables. L'extrait méthanolique a présenté les teneurs les plus élevées (227.92 ± 0.50 mg EAG/g et 214.28 ± 1.79 mg EAT/g). Quant au jus de grenade, une importante teneur en anthocyanes a été enregistré (1586.39 ± 44.18 mg ECG/l).

L'évaluation, in vitro, de l'activité antioxydante des extraits par les méthodes ; piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP) et le blanchiment du β -carotène/acide linoléique a révélé un fort pouvoir antioxydant pour l'ensemble des extraits étudiés. Toutefois, le jus de grenade a présenté un important pouvoir antioxydant vis-à-vis du radical libre DPPH qui se traduit par la valeur de la IC_{50} de l'ordre de 0.0012mg/ml, comparativement à l'acide ascorbique (0.013mg/ml). Il a également exprimé un fort pouvoir réducteur avec une valeur de la IC_{50} de l'ordre de 0.095 mg/ml.

Par contre, pour la méthode du blanchiment de la β -carotène, la plus importante activité antioxydante a été exercée par l'extrait méthanolique et le jus de grenade avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 89.58 ± 2.09 % et 93.06 ± 3.18 %, respectivement.

De plus, sur la toxicité aigüe, *Punica granatum* L. est relativement sans danger, ce qui justifie son utilisation empirique et constitue un réel avantage à sa vulgarisation comme médicament.

Les résultats obtenus à l'issue de l'étude de l'activité anti-inflammatoire in vivo, réalisée sur un modèle de l'œdème de la patte de souris induit par la carraghénine, ont montré que les extraits du grenadier à des doses de 250 et 500mg/kg exercent un effet anti-inflammatoire comparable, à celui du produit de référence Diclofenac® et par ce fait ils peuvent être considérés comme un traitement alternatif particulièrement dans la prévention de l'inflammation.

En dernier lieu, l'activité antioxydante in vivo a été étudiée en utilisant le modèle de l'intoxication au tétrachlorure de carbone sur des rats. Cette étude a révélé que les rats traités par CCl₄ ont provoqué une augmentation hautement significative des taux d'enzymes sériques, tels que l'aspartate aminotransférase, l'alanine aminotransférase et la bilirubine totale, par rapport au contrôle normale. Alors que l'administration du jus de grenade, des extraits d'extraits d'écorces et/ou de l'UDCA réduit significativement ces changements. Prouvant ainsi que le grenadier est doté d'un réel potentiel antioxydant.

Pour conclure, ces activités biologiques valident scientifiquement quelques usages traditionnels du fruit du grenadier, et ne peuvent être attribuées qu'à une partie des composés phénoliques.

Comme complément à ce présent travail, les points suivants nous semblent pertinents :

- Etablir le profil phénolique par des méthodes analytiques performantes (HPLC) des différents extraits étudiés, purifier leurs constituants et étudier leurs structures pour mettre le point sur ceux dotés d'activités biologiques.
- Entreprendre plus de travaux sur les différentes activités biologiques de la grenade afin de pouvoir isoler des composés actifs et ouvrir d'autres possibilités d'exploitation en biotechnologie et en médecine.

Références

Bibliographiques

1. **Aaby K., Skrede G., Wrolstad R.E., 2005.** Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol 53, no 10, pp. 4032–4040.
2. **Abdel-Hady N.M., 2013.** Quantitative diversity of phenolic content in peels of some selected Egyptian pomegranate cultivars correlated to antioxidant and anticancer effects. Journal of Applied Sciences Research, vol 9, no 8, pp. 4823-4830
3. **Abdel Moneim A.E., 2011.** Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. Journal of Medicinal Plants Research, vol 6, no 2, pp. 195-199.
4. **Abdureyim S., Amat N., Umar A., Upur H., Berke B., Moore N., 2011.** Anti-inflammatory, immunomodulatory, and heme oxygenase-1 inhibitory activities of ravan napas, a formulation of uighur traditional medicine, in a rat model of allergic asthma. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol 2011, pp. 13.
5. **Acar A., Akil E., Alp H., [Evlivaoglu O.](#), [Kibrisli E.](#), [Inal Ali](#), [Unan F.](#), [Tasdemir N.](#), 2012.** “Oxidative damage is ameliorated by curcumin treatment in brain and sciatic nerve of diabetic rats,” International Journal of Neuroscience, vol 122, no 7, pp. 367–372.
6. **Adams L.S., Seeram N.P., Aggarwal B.B., Takada Y., Sand D., Heber D., 2006.** Pomegranate Juice, Total Pomegranate Ellagitannins, and Punicalagin Suppress Inflammatory Cellsignaling in Colon Cancer Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.54, no.3, pp.980-985.
7. **Agarwal A., Bolisetty S., 2013.** Adaptive responses to tissue injury: Role of heme oxygenase-1. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, vol 124, p. 111-122.
8. **Agrawal S., Chandra A., 1991.** Note on physico-chemical characteristics of pomegranate fruit. Journal of Curren Opinion in Agriculture, vol 15, pp.65–66.
9. **Agarwal A., Singhvi I.J., Bele D., Sharma K, Gupta SK., 2011.** Evaluation of steroids in face creams of different marketed brands. International Journal Pharmacy & Technology, vol 3, no 2, p. 2480-2486.
10. **Aggarwal B. B., Shishodia S., 2006.** Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochemical pharmacology, vol 71, no 10, p. 1397-142.
11. **Aggarwal B.B., Harikumar K.B., 2009.** Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol 41, p. 40–59. Doi:10.1016/j.biocel.2008.06.010

12. **Ahmed S.A., Abood, N.H. and Al-Janabi, A.A., 2013.** Antimicrobial effect of Pomegranate peels extract on some pathogenic microorganisms. *Engineering & Technology Journal*, vol 31, no 3, pp. 1-5.
13. **Ahmed S., Wang, N., Hafeez, B.B., Cheruvu, V.K., Haqqi, T.M., 2005.** *Punica granatum* L. Extracts Inhibits IL-1Beta-induced Expression of Matrix Metalloproteinases by Inhibiting the Activation of MAP Kinases and NF-kappaB in Human Chondrocytes in vitro. *Journal of Nutrition*, vol.135, no.9, pp.2096-2102.
14. **Aiyegoro O.A., Okoh A.I., 2009.** Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*. *International journal of molecular sciences*, vol 10, no 11, pp. 4990-5001.
15. **Ajaikumar K.B, Asheef M., Babu B.H., Baiju E.C. and Padikkala J., 2003.**The inhibition of gastric mucosal injury induced by aspirin and ethanol by *Punica granatum* Linn (Pomegranate) methanolic extract. *Amala Reseach Bulletin*, vol 23, pp.153-161.
16. **Akbarpour V., Hemmati K., Sharifani M., 2009.** Physical and chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit in maturation stage. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, vol 6, no 4, pp. 411-416
17. **Akhavan H., Barzegar M., Weidlich H., Zimmermann B.F., 2015.** Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars depend on extraction. *Journal of Chemistry*, vol 2015, pp.1-7.
18. **Akpinar-Bayizi A., Ozcan T., Yilmaz-Ersan L., 2012.** The therapeutic potential of pomegranate and its products for prevention of cancer: Cancer Prevention-From Mechanisms to Transitional Benefits, p.331- 372.
19. **Alam K., Pathak D., Ansari S.H., 2011.** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Ammomum subulatum* fruit extract. *International Journal of Pharmaceutical Science Drug Research*, vol 3, pp.35-37.
20. **Albrecht M., Jiang W., Kumi-Diaka J., Lansky E.P., Gommersall, L.M., Patel A., Neeman E.M.I., Geldof A.A., Campbell, M. J., 2004.** Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, vol 7, no 3, p. 274-283.
21. **Al-Halabi R., Al-Bakri I., Al-Joubbeh M., 2013.** Chemical Changes and Antioxidant Activity in Arils Juice of two Syrian Pomegranate Accessions during Fruit Maturation. *International Journal of ChemiTech Research*. CODEN (USA): IJCRGG, vol 5, no 6, pp. 2769-2781.

22. **Ali H.M., 2016.** Influence of Pomegranate *Punica granatum* as Phytochemical Rich Components on Yoghurt Drink Characteristics. *Sciences*, vol 6, no 01, pp.23-26.
23. **Ali S.I., El-Baz F.K., El-Emary G.A., Khan E.A., Mohamed A.A., 2014.** HPLC-analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol 6, no 4, p. 348-55.
24. **Al-Maiman S. A., Ahmad D., 2002.** Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry*, vol 76, no 4, p. 437-441.
25. **Aloqbi A., Omar U., Youshr M., Grace M., Lila M.A., Howell N., 2016.** Antioxidant activity of pomegranate juice and punicalagin. *Natural Science*, vol 8, no 06, pp.235.
26. **Al-Said F.A., Opara L.A., Al-Yahyai R.A., 2009.** Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering*, vol 90, no 1, p.129-134.
27. **Al-Zoreky N.S., 2009.** Antimicrobial Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *International Journal of Food Microbiology*, vol 134, no 3, p.244 - 48.
28. **Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y., 2000.** Determination of Phenolic Acids in Fruit Juices by Isocratic Column Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 891, no.1, p.183-188.
29. **Ambriz-Pérez D.L., Leyva-López N., Gutierrez-Grijalva E.P., Heredia J. B., 2016.** Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, vol 2, no 1, p. 1131412
30. **Andújar I., Recio M.C., Giner R.M., Ríos J.L., 2012.** Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol 2012, p. 1-23.
31. **Araujo J.A., Zhang M., Yin F., 2012.** Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Frontiers in pharmacology*, vol 3, pp. 119. Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00119>
32. **Ardekani, M. R. S., Hajimahmoodi, M., Oveisi, M. R., Sadeghi, N., Jannat, B., Ranjbar, A.M., Gholam N., Moridi, T., 2011.** Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, vol 10, no 3, p.519-524.
33. **Arman M., Payne H., Ponomaryov T., Brill A., 2015.** Role of Platelets in Inflammation. In *The Non-Thrombotic Role of Platelets in Health and Disease*. In Tech.

34. **Arner E.S.J., 2009.** Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, vol 1790, no 6, p. 495–526. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.01.014>
35. **Arner E.S., Holmgren A., 2006.** The thioredoxin system in cancer. In *Seminars in cancer biology*, vol 16, no 6, p. 420-426. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.10.009>
36. **Ashley N.T., Weil Z.M., Nelson R.J., 2012.** Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, vol 43, p.385-406. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530>
37. **Ashton R., 2006.** *The Incredible Pomegranate: Plant and Fruit.* Third Millennium Publishing, p. 1-118.
38. **Aslam M.N., Lansky E.P., Varani J., 2006.** Pomegranate as a Cosmeceutical Source: Pomegranate Fractions Promote Proliferation and Procollagen Synthesis and Inhibit Matrix Metalloproteinase-1 Production in Human Skin Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.103, no.3, pp.311–318.
39. **Aviram M., Dornfeld L., Rosenblat M., Volkova N., Kaplan M., Coleman R., FuhrmanB., 2000.** Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation : studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E–deficient mice. *The American journal of clinical nutrition*, vol 71, no 5, p. 1062-1076.
40. **Ayroldi E., Cannarile L., Migliorati G., Nocentini G., Delfino D.V., Riccardi C., 2012.** Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *The FASEB Journal*, vol 26, no 12, p. 4805-4820
41. **Azadzoï K.M., Schulman R.N., Aviram M., Siroky M.B., 2005.** Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *The Journal of urology*, vol 174, no 1, p. 386-93.
42. **Bachoual, R., Talmoudi, W., Boussetta, T., Braut, F., El-Benna, J., 2011.** An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. *Food and Chemical Toxicology*, vol 49, no 6, p.1224-1228
43. **Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llácer G., 1998.** Analysis of apricot germplasm from the European ecogeographical group. *Euphytica*, vol 102, no 1,p. 93-99. <https://doi.org/10.1023/A:1018332312570>

44. **Baiju E.C., Jeslin T., Padikkala J., 2015.** Free radical scavenging and anti-inflammatory activities of *Punica granatum* Linn. Fruit rind. Research & Reviews: Journal of Biology, vol 3, no 4, p. 12-15
45. **Baret A., Jadot G., Michelson, A. M., 1984.** Pharmacokinetic and anti-inflammatory properties in the rat of superoxide dismutases (Cu SODs and Mn SOD) from various species. Biochemical pharmacology, vol 33, no 17, p. 2755-2760
46. **Barnes P.J., 1998.** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. Clinical Science, vol 94, no 6, p. 557–572.
47. **Barone E., Caruso T., Mara F.P., Sottile F., 2001.** Preliminary observations on some Sicilian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. Journal American Pomological Society, vol 55, no 1, p.4–7.
48. **Barton G.M.A., 2008.** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. The Journal of clinical investigation, vol 118, no 2, p. 413-420.
49. **Bassolino L., Zhang Y., Schoonbeek H.J., Kiferle C., Perata P., Martin C., 2013.** Accumulation of anthocyanins in tomato skin extends shelf life. New Phytologist, vol 200, p. 650–655. doi: 10.1111/nph.12524
50. **Baudin B., 2006.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. MT Cardio, vol 2, no 1, p. 43- 52.
51. **Ben Abdennebi A.M., 2012.** Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) 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. Diplôme – Maitrise en Pharmacologie, Université de Montréal.
52. **Ben-Simhon Z., Judeinstein S., Trainin T., Harel-Beja R., Bar-Ya'akov I., Borochoy-Neori, H., Holland D., 2015.** A " White" anthocyanin-less pomegranate (*Punica granatum* L.) caused by an insertion in the coding region of the Leucoanthocyanidin Dioxygenase (LDOX; ANS) gene. PloS one, vol 10, no 11, pp. e0142777.
53. **Bhandary S.K., Kumari S.N., Bhat V.S., Sharmila K.P., Bekal, M.P. 2012.** Preliminary Phytochemical Screening of various extracts of *Punica granatum* peel, whole fruit and seeds. Nitte University Journal of Health Science NUJHS, vol 2, no 4, p. 34-38.
54. **Bhowmik D., Gopinath H., Kumar B.P., Kumar K., 2013.** Medicinal uses of *Punica granatum* and its health benefits. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, vol 1, no 5, p. 28-35.

55. **Bianchi M.E., 2007.** DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*, vol 81, no 1, p. 1-5. Doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
56. **Bingham S. A., Day N.E., Luben, R., 2003.** Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European prospective investigation into cancer nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, vol 361, p.1496-1501
57. **Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O., 2012.** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, vol 5, no 1, pp. 9.
58. **Boccardi V., Baroni M., Mangialasche F., Mecocci P., 2016.** Vitamin E family: role in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, vol 2, no 3, p. 182-191. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2016.08.002>
59. **Borochoy-Neori H, Judeinstein S, Tripler E, Harari M, Greenberg A, Shomer I, Holland D., 2009.** Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory Quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol 22, no 3, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.011>
60. **Bosello-Travain V., Conrad M., Cozza G., Negro A., Quartesan S., Rossetto M., Maiorino M.M., 2013.** Protein disulfide isomerase and glutathione are alternative substrates in the one Cys catalytic cycle of glutathione peroxidase 7. *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 1830:3846–3857. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.0177>
61. **Bouguerne B., 2012.** Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et études de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
62. **Boukef K., Souissi H.R., Balansard G., 1982.** Contribution to the study of plants used in traditional medicine in Tunisia. *Plant Medicine and Phytotherapy*, vol 16, p. 260–279.
63. **Boukhenouna S., 2014.** Enzymologie des étapes clés de régulation du système Peroxyrédoxine/Sulfirédoxine dans le contexte de la signalisation cellulaire redox. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.
64. **Braidy N., Selvaraju S., Essa M. M., Vaishnav R., Al-Adawi S., Al-Asmi A., Al-Senawi H., Alobaidy A.A., Lakhtakia R., Guillemain G.J., 2013.** Neuroprotective effects of a variety of pomegranate juice extracts against MPTP-induced cytotoxicity and

- oxidative stress in human primary neurons. *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol 2013, p. 1- 12.
65. **Bravo L., 1998.** Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, vol 56, no 11, p. 317–333. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
 66. **Brigelius-Flohé R., Maiorino M., 2013.** Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol 1830, no 5, p.3289-3303. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
 67. **Broz P., Monack D.M., 2013.** Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nature Reviews Immunology*, vol 13, p. 551–565. Doi: 10.1038/nri3479
 68. **Buckley C. D., Filer A., Haworth O., Parsonage G., Salmon M., 2004.** Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. *Annals of the rheumatic diseases*, vol 63, no 2, p. ii92-ii95.
 69. **Burits M., Bucar F., 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, vol 14, no 5, p. 323-328.
 70. **Burke-Gaffney A., Callister M.E.J., Nakamura H., 2005.** “Thioredoxin: friend or foe in human disease?” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol 26, no 8, p. 398–404.
 71. **Burton G.J. and Jauniaux E., 2011.** Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, vol.25, no 3, p. 287-299. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
 72. **Caceres A., Giron L.M., Alvarado S.R., Torres M.F., 1987.** Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 20, p. 223–237
 73. **Calixto J.B., Campos M.M., Otuki M. F., Santos A.R., 2004.** Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*, vol 70, no 2, p. 93–103.
 74. **Çam M., and Hışıl Y., 2010.** Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chem.*, vol 123, no 3, p. 878-885
 75. **Carbone C., Musumeci T., Pignatello R., 2013.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: *Drug–Biomembrane Interaction Studies*. p. 281-303. Doi: <https://doi.org/10.1533/9781908818348.281>
 76. **Carbonell-Barrachina, A.A., Calín-Sánchez, A., Bagatar, B., Hernández, F., Legua, P., Martínez-Font, R., Melgarejo, P., 2012.** Potential of Spanish sour-sweet

- pomegranates (cultivar C25) for the juice industry. *Food Science and Technology International*, vol 18, no 2, p. 129–138.
77. **Cardozo L.F., Pedruzzi L.M., Stenvinkel P., Stockler-Pinto M.B., Daleprane J. B., Leite Jr, M., Mafra D., 2013.** Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie*, vol 95, no 8, p. 1525-1533
 78. **Castellani P., Balza E., Rubartelli A., 2014.** Inflammation, DAMPs, tumor development, and progression: a vicious circle orchestrated by redox signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, vol 20, no 7, p. 1086–1097. Doi: 10.1089/ars.2012.5164.
 79. **Chace E.M., Church G.G., Poore H.H., 1981.** The Wonderful variety of pomegranate. *USDA Circ.* vol 98, pp.15.
 80. **Chadli R., Bouzid A., Bouzid Kh, Nader H., 2015.** Bactericidal effect of aqueous extracts of the bark of the pomegranate (*Punica granatum* L.) on Bacteria. *European Journal of Molecular Biotechnology*, vol 7, no 1, p.4-11
 81. **Chakass M.A., Carbonnier-Jarreau M.C., Verhille A.M., Reduron J.P., 2007.** Étude palynologique de trois variétés du grenadier (*Punica granatum*) au Liban. *Acta Botanica Gallica*, vol 154, no 1, p. 27-42
 82. **Chan, P. K., Hayes, A. W., 1994.** Acute toxicity and eye irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. AW Hayes, Ed. Raven Press Ltd, New York.
 83. **Chandra R., Babu D.K., Jadhav V.T., da Silva J.T., 2010.** Origin, history and domestication of pomegranate. *Pomegranate. Fruit, Vegetable. Cereal Science and Biotechnology*, vol 4, no 2, p. 1-6.
 84. **Chandra R., Lohakare A. S., Karuppannan D. B., Maity A., Singh, N. V., Jadhav, V.T., 2013.** Variability studies of physico-chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) using a scoring technique. *Fruits*, vol 68, no 2, p.135-146.
 85. **Chaplin D.D., 2010.** Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol 125, no 2, p. S3-S23.
 86. **Charles N.S., Peter A.W., Derek W.G., 2010.** *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, p. 2-3.
 87. **Chaudhari S. M., Patel K.Y., Badole S.L., 2014.** *Punica granatum* (Pomegranate Fruit): In Cancer Treatment. In *Polyphenols in human health and disease*. Chapter 106, p. 1393-1400.

88. **Chauhan R.D., Kanwar K., 2012.** Biotechnological advances in pomegranate (*Punica granatum* L.). In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol 48, no 6, p. 579-594
89. **Chen B.T., Li W.X., He R.R., Li Y.F., Tsoi B., Zhai Y.J., Kurihara H., 2012.** Anti-inflammatory effects of a polyphenols-rich extract from tea (*Camellia sinensis*) flowers in acute and chronic mice models. *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol 2012, p. 1-7.
90. **Chebaibi A, Filali FR., 2013.** Bactericidal activity and phytochemical screening of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel aqueous extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol 7, no 14, p. 887-891. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.988>
91. **Chen Y.I., Wei P.C., Hsu J.L., Su F.Y., Lee W.H., 2016.** NPGPx (GPx7): a novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. *American Journal of Translational Research*, vol 8, no 4, p. 1626–1640.
92. **Chu F.F., Doroshov J.H., Esworthy R.S., 1993.** Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI, *Journal of Biological Chemistry*, vol 268, no 4, p.2571–2576.
93. **Clark R.A., 2013.** The molecular and cellular biology of wound repair. Springer Science & Business Media. Pp. 133
94. **Coutinho A.E., Chapman K.E., 2011.** The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and cellular endocrinology*, vol 335, no 1, p.2-13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>
95. **Cuendet M., Hostettman K., Potterat O., Dyatmiko W., 1997.** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, vol 80, no 4, p. 1144-1152.
96. **Das S., Barman S., 2012.** Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic extract of leaves of *Punica granatum* in alloxan-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus albino rats. *Indian journal of pharmacology*, vol 44, no 2, pp.219.
97. **Das S., Sama G., 2009.** Antidiabetic Action of Ethanolic Extracts of *Punica granatum* Linn. in alloxan-induced Diabetic Albino Rats. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 2, no 1, p. 14-21.
98. **Dasgupta, A. and Klein, K., 2014.** Antioxidants in food, vitamins and supplements: Prevention and treatment of disease. Academic Press.

99. **Da Silva E.Z., Jamur M.C., Oliver C., 2014.** Mast cell function: a new vision of an old cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol 62, no 10, p. 698–738. Doi: <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
100. **Deore Leena P., Bachhav Devidas G., Nikam Vikas K., Heda Amol J., 2016.** Study of anthelmintic and antimicrobial activity of peel extract of *Punica granatum* Linn. *European Journal of Pharmaceutical and medical research*, vol 3, no 4, p.292-297.
101. **De Souza R.F., De Giovani W.F., 2004.** Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, vol 9, no 2, p. 97-104.
102. **Dorman H.J.D., Peltoketo A., Hiltunen R., Tikkanen M.J., 2003.** Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry*, vol 83, no 2, p. 255-262
103. **Drayton D.L., Liao S., Mounzer R. H., Ruddle N. H., 2006.** Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature immunology*, vol 7, no 4, p. 344–353. Doi : 10.1038/ni1330
104. **Duan X.J., Zhang W.W., Li X.M., Wang, B.G., 2006.** Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food chemistry*, vol 95, no 1, p. 37-43.
105. **Durgaç C., Özgen M., Simsek3 Ö., Kaçar Y.A., Kiyga Y., Çelebi S., Gündüz K., Serçe S., 2008.** Molecular and pomological diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, vol 7, no 9, p.1294-1301.
106. **Dutta T., 2016.** Antioxidants and its effects. *Journal of Evolution of Research in Human Physiology*, vol. 2, no 2, p.10-14.
107. **El-Daly A.A., 2016.** Pomegranate peels Extract Protects Cadmium-induced nephrotoxicity in albino mice *Journal of Bioscience and Applied Research*, vol 2, p. 362-375.
108. **El-Habibi E.M., 2013.** Renoprotective effects of *Punica granatum* (pomegranate) against adenine-induced chronic renal failure in male rats. *Life Science Journal*, vol 10, no 4, p. 2059-2069.
109. **EL-HACI I.A., 2016.** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales endémiques du sud de l'Algérie: *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., *Anabasis aretioides* Moq. & Coss. et *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen.

110. **Elfalleh W., Hannachi H., Tlili N., Yahia Y., Nasri N., Ferchichi A., 2012.** Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research* vol 6, no 32, p. 4724-4730.
111. **Elfalleh W., Tlili N., Nasri N., Yahia Y., Hannachi H., Chaira N., Ying M., Ferchichi A., 2011.** Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *Journal of Food Science*, vol 76, no 5, p. C707-C713
112. **El Kar C., Ferchichi A., Attia F., Bouajila J., 2011.** Pomegranate (*Punica granatum*) Juices: chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity. *Journal Food of Science*, vol 76, p.95–800.
113. **El-Khadragy M. F., 2011.** Hepatoprotective role of the pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *African Journal of Biological Sciences*, vol 7, no 1, p. 135-149.
114. **Erkan M., Kader A.A., 2011.** Pomegranate (*Punica granatum* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Mangosteen to White Sapote*, pp. 287e-313e
115. **Evreinoff V.A., 1957.** Contribution à l'étude du Grenadier. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée*, vol 4, no 3, p. 124-138.
116. **Faria A., Calhau C., 2010.** Pomegranate in human health: An overview. In *Bioactive Foods in Promoting Health*. Chapter 23, p. 551-563.
117. **Faure S., 2009.** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités pharmaceutiques*, vol 48, no 489, p. 53-58. Doi : [https://doi.org/10.1016/S0515-3700\(09\)70493-8](https://doi.org/10.1016/S0515-3700(09)70493-8)
118. **Fawole O.A., Opara U.L., Theron K.I., 2012.** Chemical and phytochemical properties and antioxidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa. *Food and Bioprocess Technology*, vol 5, no 7, p.2934-2940
119. **Fawole O.A., Opara U.L., 2013.** Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review. *Scientia Horticulturae*, vol 159, p. 152-161.
120. **Fawole O.A., Opara U.L., 2013.** Effects of maturity status on biochemical concentration, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. 'Bhagwa'). *South African Journal of Botany*, vol 85, p.23–31.
121. **Fawole O.A., Opara U.L., 2013.** Changes in physical properties, chemical and elemental composition and antioxidant capacity of pomegranate (cv. 'Ruby') fruit at five maturity stages. *Scientia Horticulturae*, vol 150, p.37–46

122. **Fernandes, L., Pereira, J. A. C., López-Cortés, I., Salazar, D. M., Ramalhosa, E.C., 2015.** Physicochemical Changes and Antioxidant Activity of Juice, Skin, Pellicle and Seed of Pomegranate (cv. Mollar de Elche) at Different Stages of Ripening. *Food technology and biotechnology*, vol 53, no 4, pp.397.
123. **Ferrara G., Cavoski I., Pacifico A., Tedone L., and Mondelli D., 2011.** Morphopomological and chemical characteriza- tion of pomegranates (*Punica granatum* L.) genotypes in Apulia Region, Southeastern Italy. *Scientia of Horticulturae*, vol 130, p. 599–606.
124. **Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araujo M.E.M., 2006.** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, vol 108, no 1, p. 31-37.
125. **Flora S.J.S., 2009.** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol 2, no 4, p. 191-206
126. **Foster P. S., Rosenberg H. F., Asquith K. L., Kumar R. K., 2008.** Targeting eosinophils in asthma. *Current Molecular Medecine*, vol 8, no 6, p. 585–590
127. **Frankel E.N., Huang S.-W., Kanner J., German J.B., 1994.** Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol 42, p.1054-1059.
128. **Frankel E.N., Meyer A.S., 2000.** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol 80, p. 1925-1940.
129. **Fratelli M., Demol H., Puype M., [Casagrande S.](#), [Eberini I.](#), [Salmona M.](#), [Bonetto V.](#), [Mengozzi M.](#), [Duffieux F.](#), [Miclet E.](#), [Bachi A.](#), [Vandekerckhove J.](#), [Gianazza E.](#), [Ghezzi P.](#), 2002.** “Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 99, no 6, p. 3505–3510.
130. **Frenzel L., Hermine O., 2013.** Mast cells and inflammation. *Joint Bone Spine*, vol 80, no 2, p. 141-145. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.08.013>
131. **Fischer U. A., Carle R., Kammerer D.R., 2011.** Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chemistry*, vol 127, p. 807-821

132. **Fiset M.É., Gilbert C., Poubelle P.E., Pouliot M., 2003.** Human neutrophils as a source of nociceptin: a novel link between pain and inflammation. *Biochemistry*, vol 42, no 35, p. 10498-10505. Doi : 10.1021/bi0300635
133. **Furie M.B., 2014.** An Overview of Inflammation. A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms, reference module in Biomedical Sciences, p. 226-230. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01801-3>
134. **Fürst R., Zündorf I., 2014.** Plant-Derived Anti-Inflammatory Compounds: Hopes and Disappointments regarding the Translation of Preclinical Knowledge into Clinical Progress. *Mediators of Inflammation*, vol 2014, pp. 9. Doi:10.1155/2014/146832
135. **Galask R.P., Larsen B., 2012.** Infectious diseases in the female patient. Springer Science & Business Media. Pp.61
136. **Gallie D.R., 2013.** “L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development,” *Scientifica*, vol 2013, pp. 24. Doi:10.1155/2013/795964.
137. **Gattorno M., Martini A., 2016.** Inflammation and its mediators. In: Petty R., Ronald Laxer R., Lindsley C., Wedderburn L., ed. *Textbook of pediatric rheumatology*. 7th Edition. Philadelphia: Elsevier, p. 14–32.
138. **Ghadge K. S., Jadhav B.D., 2015.** Physico-chemical properties, estimation of total sugars and vitamin C content of pomegranate cultivars Arakta and Ganesh: A comparative investigation *J. Chemical and Pharmaceutical Research*, vol 7, no 8, p. 670-675.
139. **Ghezzi P., 2011.** “Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung,” *International Journal of General Medicine*, vol 4, pp. 105–113
140. **Ghezzi P., 2013.** “Protein glutathionylation in health and disease,” *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*, vol 1830, no 5, pp. 3165–3172.
141. **Ghosh D., Konishi T., 2007.** Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, vol. 16, no 2, p.200–208.
142. **Gil M.I., Tomás-Barberán F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A., 2000.** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, vol 48, no 10, p. 4581-4589.
143. **Gil M., Garcia-Viguera C., Artés F., Tomás-Barberán F., 1995.** Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol 68, p.77–81.

144. **Glorieux C., Zamocky M., Sandoval J.M., Verrax J., Calderon P.B., 2015.** Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, vol 87, p. 84-97. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017>
145. **Gould K.S., 2004.** Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Biomed Research International*, p.314–320.
146. **Goor A., 1967.** The history of the pomegranate in the holy land, *Economic Botany*, vol 21, no 3, p. 215-230.
147. **Gozlekci S., Kaynak L., 2000.** Physical and chemical changes during fruit development and flowering in pomegranate *Punica granatum* L. cultivar Hicaznar grown in Antalya region. *Options Mediterraneennes Serie A, Seminaires Mediterraneens*, vol 42, p. 79-85
148. **Gözlekçi Ş., Saraçoğlu O., Onursal E., Özgen M., 2011.** Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacognosy Magazine*, vol 7, no 26, p. 161.
149. **Grosser T., Fries S., FitzGerald G.A., 2006.** Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *The Journal of clinical investigation*, vol 116, no 1, p.4-15.
150. **Gujral M.L., Varma D.R., Sareen K.N., 1960.** Oral contraceptives. Part 1. Preliminary observations on the antifertility effect of some indigenous drugs. *Indian Journal of Medical Research*, vol 48, p. 46–51.
151. **Guo C., Cao G., Sofic E., Prior R.L., 1997.** High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables. Relationships to oxygen radical absorbance capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol 45, p. 1787–1796.
152. **Guo C., Wei J., Yang J., Xu J., Pang W., Jiang Y., 2008.** Pomegranate Juice is Potentially Better than Apple Juice in Improving Antioxidant Function in Elderly Subjects. *Nutrition Research*, vol. 28, no.1, pp. 72-77.
153. **Habtezion A., Kwan R., Yang A.L., Morgan M.E., Akhtar E., Wanaski S.P., Collins S.D., Butcher E.C., Kamal A., Omary M.B., 2011.** Heme oxygenase-1 is induced in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute pancreatitis: a potential therapeutic target. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol 300, no 1, p. G12–G20.
154. **Hagerman A.E., 2002.** Hydrolyzable tannin structural chemistry. *Tannin Handbook*. Miami University: Miami, FL, USA

155. **Hagir G.A.E., Alsheikh A.A., Khadiga G.A.E., 2016.** Phytochemical screening and antibacterial activity of *Punica granatum* fruit rind extracts. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, vol 4, no 4, p.9-15.
156. **Hajoori M., Naik M., Naik K., Desai Bhagwan S., 2014.** Evaluation of antimicrobial activity of *Punica granatum* peel extracts using different solvent system, *International journal of Pharmacological Screening Methods*, vol 4, no 1, p. 26-31.
157. **Hall A., Karplus P.A., Poole L.B., 2009.** Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions. *The FEBS Journal*, vol 276, p.2469–2477. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x>
158. **Halliwell B., 2012.** Free radicals and antioxidants: updating a personal view, *Nutrition Reviews*, vol 70, no 5, p. 257–265. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
159. **Halliwell B. and Gutteridge J.M., 2015.** Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA.
160. **Haque N., Sofi G., Ali W., Rashid M., Itrat M., 2015.** A comprehensive review of phytochemical and pharmacological profile of Anar (*Punica granatum* Linn): A heaven's fruit. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, vol 1, no 1, p. 22-26
161. **Harborne J.B., 1998.** Phytochemical method, A Guide to Modern technique of Plant Analysis. 3rd Edition, Chapman and Hall. New York, pp. 198.
162. **Hatfield D.L., Berry M.J., Gladyshev V.N., 2011.** Selenium: its molecular biology and role in human health. Springer Science & Business Media.
163. **Hattori I., Nakamura H., Masutani H., Nishinaka Y., Mitsui A., Yodoi J., 2002.** Thioredoxin-dependent redox regulation – implication in aging and neurological diseases. *Critical reviews of oxidative stress and aging*, vol II, p.87 – 101. Doi: https://doi.org/10.1142/9789812775733_0005
164. **Haydent M.R., Tyagi S.C., 2002.** Neural redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes. *Journal of the Pancreas*, vol 3, p. 126-138.
165. **Hawkey C.J., 2001.** COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol 15, no 5, p. 801-820. Doi: <https://doi.org/10.1053/bega.2001.0236>
166. **He J., Giusti M.M., 2010.** Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, vol 1, p. 163–187. doi: [10.1146/annurev.food.080708.100754](https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754)
166. **Hegde CR, Madhuri M, Swaroop T, Nishitha D, Arijit L, Bhattacharya S, Rohit KC. 2012.** Evaluation of antimicrobial properties, phytochemical contents and

- antioxidant capacities of leaf extracts of *Punica granatum* L. ISCA, Journal of Biological Sciences vol 1, no 2, p. 32-37.
167. **Hepaksoy S., Aksoy U., Can H.Z., Ui M.A., 1998.** Determination of relationship between fruit cracking and some physiological responses, leaf characteristics and nutritional status of some pomegranate varieties. I.In: Symposium Internacional Sobre el Granado, Orihuela. Alicante, Espana.
 168. **Herbette S., Roeckel-Drevet P., Drevet J.R., 2007.** Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *The FEBS Journal*, vol 274, no 9, p. 2163–2180. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05774.x>
 169. **Hernandez F., Melgarejo P., Tomas-Barberran F.A., Artes F., 1999.** Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology*, vol 210, p. 39–42
 170. **Hernández F., Legua P., Martínez R., Melgarejo P., Martínez J.J., 2014.** Fruit quality characterization of seven pomegranate accessions (*Punica granatum* L.) grown in Southeast of Spain, *Scientia Horticultura*, vol 175, p. 174–180
 171. **Herter J.M., Rossaint J., Zarbock A., 2014.** Platelets in inflammation and immunity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol 12, no 11, p. 1764-1775. Doi : <https://doi.org/10.1111/jth.12730>
 172. **Hmid I., 2013.** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum* L.): caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Doctoral dissertation, Université d'Angers, France.
 173. **Hmid I., Elothmani D., Hanine H., Oukabli A., Mehinagic E., 2013.** *Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (Punica granatum L.) cultivars grown in Morocco.* *Arabian Journal of Chemistry*, vol 10, no 2, S2675-S2684
 174. **Hmid I., Hanine H., Elothmani D., Oukabli, A., 2016.** The physico-chemical characteristics of Moroccan pomegranate and evaluation of the antioxidant activity for their juices. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. **Holers V.M., 2000.** Complement as a regulatory and effector pathway in human diseases. In *Therapeutic Interventions in the Complement System*. Humana Press, Totowa, NJ, p. 1-32. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-59259-017-9_1
 175. **Holland D., Hatib K., Bar-Ya'akov I., 2009.** Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*, vol 35, p.127- 191.

176. **Holmgren A., Bjornstedt M., 1995.** Thioredoxin and thioredoxin reductase. In *Methods in enzymology*, vol 252, pp. 199-208. Doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52023-6)
177. **Holmgren A., Lu J., 2010.** Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochemical and biophysical research communications*, vol 396, no 1, p. 120-124. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.083>
178. **Hora J.J., Maydew E.R., Lansky E.P., Dwivedi C., 2003.** Chemopreventive Effects of Pomegranate Seed Oil on Skin Tumor Development in CD1 Mice. *Journal of Medicinal Food*, vol 6, no 3, p. 157-161
179. **Hou D.X., Fujii M., Terahara N., Yoshimoto M., 2004.** Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. *Biomed research international*, vol 5,p. 321–325.
180. **Huang D.O. and Prior B.R., 2005.** “The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays,” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6, p. 1841-1856. [doi:10.1021/jf030723c](https://doi.org/10.1021/jf030723c)
181. **Huang F.Y., Wang C.C., Zhou S. L., [Huang Y.H.](#), [Wang H.](#), [Chen F.](#), [Lin Y.Y.](#), [Tan G.H.](#), [Liu J.B.](#), 2009.** Antisense interleukin-5 reduces eosinophil infiltration and hyperresponsiveness in an allergic asthma model. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, vol 27, no 1, p. 35–41.
182. **Huang S.Q., Ding S.D., Fan L.P., 2012.** Antioxidant activities of five polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol 50, p.1183–1187
183. **Hubert A.J., 2006.** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de Soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat de l’institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, pp. 174.
184. **Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C.B., Rahu N., 2016.** Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us ?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol 2016, pp. 9. Doi:10.1155/2016/7432797.
185. **Ichikawa D., Matsui A., Imai M., Sonoda Y., Kasahara T., 2004.** Effect of various catechins on the IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages and a

- macrophage cell line, J774.1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol 27, no 9, p. 1353–1358.
186. **Iqbal S., Bhangar M.I., Anwar F., 2005.** Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, vol 93, p. 265–272
187. **Inoue Y., Matsuda T., Sugiyama K.I., Izawa S., Kimura A., 1999.** Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol 274, p. 27002–27009. Doi: <http://doi.org/10.1074/jbc.274.38.27002>
188. **Ismail F.A., Abdelatif S.H., El-Mohsen N.R.A., Zaki S.A., 2014.** The physico-chemical properties of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) extracted from two Egyptian varieties. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, vol 9, no 1, p. 29-35.
189. **Isoke Y., Kato T., Arita M., 2012.** Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. *Frontiers in Immunology*, vol 3, p. 270. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00270>
190. **Jouzeau J.Y., Daouphars M., Benani A., Netter P., 2004.** Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroentérologie clinique et biologique*, vol 28, no 2, p.7-17. Doi : [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(04\)95274-8](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(04)95274-8)
191. **Jiang Q. 2014.** Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, vol 72, p. 76-90. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035>
192. **Jurenka J., 2008.** Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative medicine review*, vol 13, no 2, pp. 128.
382. **Kadi H., Moussaoui A., Benmehdi H., Lazouni H. A., Benayahia A., Boudarba N.N., 2011.** Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Punica granatum* L. bark. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol 01, no 10, p. 180-182.
383. **Kanoun Kh., Bouziane A., Bénine M.L., Benmahdi F.Z., Marouf B., 2014.** Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorces de *Punica granatum* Linn sur deux souches phytopathogènes : *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Et *Fusarium oxysporum* F.sp *Radialis lycopersici*. *European Scientific Journal*, vol 10, no 12, p. 1857 – 7881
384. **Kasliwal, A and F. Quadri, 2016.** Evaluation of Antioxidant Activity of *Punica granatum*. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, vol 5, no 7, p. 12179-12188.

385. **Kawakami T., 2008.** Basophils now enhance memory. *Nature immunology*, vol 9, vol 7, p. 720-721.
386. **Kehrer, J.P. and Klotz, L.O., 2015.** Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Critical reviews in toxicology*, vol. 45, no 9, p. 765-798. Doi: <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1074159>
387. **Kesur P, Gahlout M, Chauhan P, Prajapati HV., 2016.** Evaluation of antimicrobial properties of peels and juice extract of *Punica granatum* (Pomegranate). *International Journal of Research and Scientific Innovation*, vol 3, p. 11-20.
388. **Khan A.A., Rahmani A.H., Aldebasi H., Aly S.M., 2014.** Biochemical and Pathological Studies on Peroxidases–An Updated Review. *Global journal of health science*, vol 6, no 5, pp. 87. Doi: <http://dx.doi.org/10.5539/gjhs.v6n5p87>
389. **Kim Y.M., Pae H.O., Park J.E., Lee Y.C., Woo J.M., Kim N.H., Choi Y.K., Lee B.S., Kim S.R., Chung, H.-T., 2011.** Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol 14, no 1, p. 137–167. Doi: <http://doi.org/10.1089/ars.2010.3153>
390. **Kim H.P., Lim H., Kwon Y.S., 2017.** Therapeutic potential of medicinal plants and their constituents on lung inflammatory disorders. *Biomolecules and Therapeutics*, vol 25, no 2, p. 91–104. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.187>
391. **Kim G. H., Kim J.E., Rhie S. J., Yoon S., 2015.** The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*, vol 24, no 4, p. 325-340. Doi: <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>
392. **Klinger M.H., Jelkmann W., 2002.** Role of blood platelets in infection and inflammation. *Journal of interferon & cytokine research*, vol 22, no 9, p. 913-922. Doi : <https://doi.org/10.1089/10799900260286623>
393. **Koechlin-Ramonatox C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, vol. 20, no 4, p. 165-177.
394. **Khalil E. A., 2004.** Antidiabetic effect of an aqueous extract of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peels in normal and alloxan diabetic rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, vol 16, no 1, p. 92-99.
395. **Khodade M.S., Wavhal K.N., Kale P. N., 1990.** Physico-chemical changes during growth and development of pomegranate fruit, *Indian Journal of Horticulture*, vol 47, p.21–27

396. **Kong J.M., Chia L.S., Goh N.K., Chia T.F., Brouillard R., 2003.** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, vol 64, p.923–933.
397. **Kokate C.K., 2005.** A textbook of Practical Pharmacognosy. 5th ed. Vallabh Prakashan New Delhi, p. 107-111.
398. **Kowalczyk E., Krzesiński P., Kura M., Szmigiel B., Blaszczyk J., 2003.** Anthocyanins in medicine. *Polish Journal of Pharmacology*, vol 55, p.699–702
399. **Kriska T., Levchenko V.V., Chu F.F., Esworthy R.S., Girotti A.W., 2008.** Novel enrichment of tumor cell transfectants expressing high levels of type 4 glutathione peroxidase using 7 α -hydroperoxycholesterol as a selection agent. *Free Radical Biology & Medicine*, vol 45, p. 700–707.
400. **Krinsky N.I., 1992.** Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol 200, no 2, p. 248–54.
401. **Krystel-Whittemore M., Dileepan K.N., Wood J.G., 2016.** Mast cell: a multi-functional master cell. *Frontiers in immunology*, vol 6, p. 620.
402. **Kurutas E.B., 2016.** The importance of antioxidants which play a role in cellular response against oxidative/ nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, vol 15, pp. 71. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>
403. **Kulkarni A.P. and Aradhya S.M. 2005.** Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, vol 93, p.319–324
404. **Kunkel E.J., Ley K., 1996.** Distinct phenotype of E-selectin–deficient mice: E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circulation research*, vol 79, no 6, p.1196-1204.
405. **Kylli, P., 2010.** Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties
406. **Kyrikou I., Hadjikakou S.K., Kovala-Demertzi D., Viras K., Mavromoustakos T., 2004.** Effects of non-steroid anti-inflammatory drugs in membrane bilayers. *Chemistry and physics of lipids*, vol 132, no 2, p. 157-169.
407. **Labib R.M., El-Ahmady S.H., 2015.** Antinociceptive, anti-gastric ulcerogenic and anti-inflammatory activities of standardized Egyptian pomegranate peel extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol 5, no 1, p. 48–51. **Lachapelle M.Y., Drouin G., 2011.** Inactivation dates of the human and guinea pig vitamin C genes. *Genetica*, vol 139, p. 199—207
408. **Laguerre M., Lopez-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P., 2007.** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Fondamental*, vol 14, no 5 , p.278-292.

409. **Lamy E., Pinheiro C., Rodrigues L., Capela-Silva F., Lopes O., Tavares S., Gaspar R., 2016.** Determinants of tannin-rich food and beverage consumption: oral perception vs. psychosocial aspects.
410. **Lansky E.P., Newman R.A., 2007.** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, vol 109, no 2, p. 177-206.
411. **Lantzouraki, D. Z., Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P. G., Glamočlija, J., Ćirić, A., Soković, M., Proestos C., 2015.** Antiradical–antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from different cultivars: a comparative study. *RSC Advances*, vol 5, no 4, p. 2602-2614.
412. **Lee J., 2010.** Degradation kinetics of grape skin and seed proanthocyanidins in a model wine system. *Food chemistry*, vol 123, no 1, p.51-56.
413. **Lee C.J, Chen L.G., Liang W.L., Wang C.C., 2010.** Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, vol 118, p.315–22.
414. **Lee J., Watson R.R., 1998.** Pomegranate: a role in health promotion and AIDS. *Nutrients and Foods in AIDS179, CRC Press, Boca Raton, FL*, vol 192, p. 179-192.
415. **Lei X.G., Zhu J.H., Cheng W.H., Bao Y., Ho Y.S., Reddi A.R., Holmgren A., Arnér E.S., 2015.** Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiological reviews*, vol 96, no 1, p. 307-364
416. **Letteron P, Labbe G, Degott C, Berson A, Fromentry B, Delaforge M, Larrey D., 1990.** Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochemical Pharmacology*, vol 39, p. 2027-2034
417. **Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourshargh S., 2007.** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, vol 7, p. 678–689.
418. **Levin G.M., 2006.** Pomegranate roads: a Soviet botanist's exile from Eden. *Pomegranate Roads*, p. 35-87
419. **Li R., Guo W., Fu Z., Ding G., Zou Y., Wang Z., 2011.** Hepatoprotective action of *Radix Paeoniae Rubra* aqueous extract against CCl₄-induced hepatic damage. *Molecules*, vol 16, no 10, p. 8684-8693.
420. **Li J., Lin J.C., Wang H., Peterson J.W., Furie B.C., Furie B., Booth S.L., Volpe J.J., Rosenberg P.A., 2003.** Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to

- developing oligodendrocytes and neurons. *Journal of Neuroscience*, vol 23, no 13, p. 5816-5826.
421. **Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J., Cheng S., 2006.** Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, vol 96, p. 254–260
- Lu J., Holmgren A., 2014.** The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, vol 66, p. 75-87. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
422. **Li X., Wasila H., Liu L., Yuan T., Gao Z., Zhao, B., Ahmad I., 2015.** Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food chemistry*, vol 175, p. 575-584.
423. **Li J., Ou-Lee T.A., Raba R., Amundson R.G., Last R.L., 1993.** Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell*, vol 5, p.171–179.
424. **Liu B., Qian J.M., 2015.** Cytoprotective role of heme oxygenase-1 in liver ischemia reperfusion injury. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, vol 8, no 11, p. 19867-19873.
425. **Liu L.Y., Mathur S. K., Sedgwick J.B., Jarjour N.N., Busse W.W., Kelly E., 2006.** A. Human airway and peripheral blood eosinophils enhance Th1 and Th2 cytokine secretion. *Allergy; European journal of Allergy and Clinical immunology*, vol 61, no 5, p. 589–597. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01060.x>
426. **Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N., 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, vol 4, no 8, pp.118.
427. **Lou O., Alcaide P., Luscinskas F.W., Muller W.A., 2007.** *CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils*. *Journal of Immunology*, vol 178, no 2, p. 1136–1143.
428. **Lyoumi S., Tamion F., Leplingard A., Beaumont C., Puy H., Lebreton J.P., 2007.** Rôles protecteurs de l'hème oxygénase et des catabolites de l'hème. *Hématologie*, vol 13, no 4, p. 251-264. Doi: 10.1684/hma.2007.0163.
429. **Mahmoud K. A., Ibrahim G.E., 2013.** Antioxidant Activity and the relationship with Phenolic Composition in some Egyptian Pomegranate Cultivars. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, vol. 6, no. 1B, pp. 353 – 368
430. **Mansour E., Haddad M., Abid M., Bachar K., Ferchichi A., 2011.** Selection of pomegranate (*Punica granatum* L.) in south-eastern Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, vol 10, no 46, p.9352-9361

431. **Mansour S., 2015.** Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium* L., *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scarbooides* - Etude in vivo. Thèse de doctorat. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF
432. **Marakala V.,2015.** Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Free Radicals, Antioxidants, Cancer. Oxidant- antioxidant imbalance in cancer: A review, Journal of Evolution of Research in Medical Biochemistry, vol 1, no 1, p. 18-23.
433. **Margis R., Dunand C., Teixeira F.K., Margis-Pinheiro M., 2008.** Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. The FEBS Journal, vol 275, no 15, p. 3959-3970.
434. **Marhuenda, J., Alemán, M. D., Gironés-Vilaplana, A., Pérez, A., Caravaca, G., Figueroa, F., Zafrilla, P., 2016.** Phenolic composition, antioxidant activity, and in vitro availability of four different berries. Journal of Chemistry, vol 2016, pp.7.
435. **Maroon J.C., Bost J. W., Maroon A., 2010.** Natural anti-inflammatory agents for pain relief. Surgical Neurology International, vol 1, p. 1–80. Doi:10.4103/2152-7806.73804
436. **Mars M., 1998.** Pomegranate plant material: genetic resources and breeding (review).In: I Symposium Internacional sobre el granado. MV-0. Orihuela (Alicante).
437. **Martinez J.J., Melgarejo P., Hernández F., Salazar D.M., Martinez R., 2006.** Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. Scientia Horticulturae, vol 110, no 3, p. 241-246. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.018>
438. **Marzocco S, Di Paola R, Serraino I, Sorrentino R, Meli R, Mattaceraso G. 2004.** Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. European Journal of Pharmacology, vol 484, no 2-3, p. 341-350. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.11.011>
439. **Medzhitov R., 2008.** Origin and physiological roles of inflammation. Nature, vol 454, no 7203, pp. 428- 435.
440. **Mehmood A, Hamid I, Sharif A, Akhtar MF, Akhtar B, Saleem A, Iqbal J, Shabbir M, Ali S., 2016.** Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of aqueous and ethanolic extracts of seeds of *Buchanania Lanzas* Spreng, in animal models. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, vol 73, p.1601-1608.
441. **Meira N.A., Klein L.C., Jr., Rocha L.W., 2014.** Anti-inflammatory and anti-hypersensitive effects of the crude extract, fractions and triterpenes obtained from

- Chrysophyllum cainito* leaves in mice. Journal of Ethnopharmacology, vol 151, p. 975–983.
442. **Melgarejo P., 1993.** Selección y tipificación varietal de granado (*Punica granatum* L.). Thesis Doctoral. U.P.V., Valencia
443. **Melgarejo P., Salazar D., 2003.** Treaty of fruit production for arid and semi-arid areas: carob, pomegranate and jujube, vol II. Madrid, Spain: Mundi-Prensa Libros SA.
444. **Melgarejo-Sánchez P., Martínez J.J., Hernandez F., Legua P., Martínez R., Melgarejo P., 2015.** Pomegranate Tree in the World: New Cultivars and Uses. Acta horticulturae, no 1089, p. 327-332
445. **Melgarejo M. P., Martínez V. R., 1992.** El granado. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
446. **Mena P., García-Viguera C., Navarro-Rico J., Moreno D. A., Bartual J., Saura D., Martí N., 2011.** Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol 91, no 10, p. 1893-1906
447. **Meziane Z.K., Elothmani D., Benhadja L.B., 2016.** Morphological and physicochemical characteristics of three pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in northern Algeria. Fruits, vol 71, no 1, p. 17-26.
448. **Mertens-Talcott, S.U., Jilma-Stohlawetz, P., Rios, J., Hingorani, L. and Derendorf, H., 2006.** Absorption, metabolism and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol 54, p. 8956-8961.
449. **McClung J.P., Roneker C.A., Mu W., Lisk D.J., Langlais P., Liu F., Lei X.G., 2004.** Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol 101, no 24, p. 8852-8857. Doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308096101>
450. **Middha S.K., Usha T., Pande V., 2013.** HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. Advances in pharmacological sciences, vol 2013.
451. **Miguel G, Dandlen S, Antunes D, Neves A, Martins D., 2004.** The effect of two methods of pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice extraction on quality during storage at 4°C. BioMed Research International, vol 5, p.332-337
452. **Millet A., 2014.** Rôle pro-inflammatoire et immunomodulateur de la protéinase 3 membranaire exprimée au cours de l'apoptose: implications dans la granulomatose avec polyangéite. Thèse de doctorat. Université René Descartes-Paris V.

453. **Mills S., Bone K., 2000.** Principles and Practice of Phytotherapy, 1st ed. Churchill Livingstone, Edinburgh
454. **Mirdehghan S.H., Rahemi M., 2007.** Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, vol 111, p. 120–127
455. **Mittal M., Siddiqui M.R., Tran K., Reddy S. P., Malik A. B., 2014.** Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*, vol 20, no 7, p. 1126-1167.
456. **Mohamed S., 2014.** Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science & Technology*, vol 35, p. 114–128.
457. **Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK., 2013.** Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. *PLoS One*, vol 8, no 4, p.e60269.
458. **Monaghan B.R., Schmitt F.O., 1932.** The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, vol 96, p. 387-395
459. **Moorthy K., Punitha T., Vinodhini R., Sureshkumar B.T., Vijayalakshmi P., Thajuddin N., 2013.** Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn. (PERICARP). *Journal of Medicinal Plants Research*, vol 7, no 9, p. 474-479.
460. **Morteza-Semnani K., Mahmoudi M., Heidar M.R., 2006.** Analgesic activity of the methanol extract and total alkaloids of *Glaucium paucilobum*. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, vol 28, p.151–155.
461. **Morton, J.F., 1987.** Pomegranate. In: *Fruits of Warm Climates*. Julia F. Morton, Miami, FL, p. 352–355
462. **Mueller L., Boehm V., 2011.** Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays. *Molecules*, vol 16, no 2, p. 1055-1069.
463. **Muller W.A., 2013.** Getting leukocytes to the site of inflammation. *Veterinary pathology*, vol 50, no 1, p.7-22. Doi : [10.1177/0300985812469883](https://doi.org/10.1177/0300985812469883)
464. **Murthy K. N. C., Singh R. P., Jayaprakasha G. K., 2002.** Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol 50, no 1, p. 81-86.
465. **Nagar A., Sharma V., Chhipa A.S., 2017.** Role of antioxidants in biological system. *Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences*, vol 6, no 1, p. 7-12.

466. **Nagaraju N., Rao K.N., 1990.** A survey of plant crude drugs of Rayalaseema, Andhra Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 29, p.137–158.
467. **Naguib Y.W., Cui Z., 2014.** Nanomedicine: The promise and challenges in cancer chemotherapy. In: *Nanomaterial*. Springer, Dordrecht, p. 207-233. Doi: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0_11
468. **Nantel F., Denis D., Gordon R., 1999.** Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology*, vol 128, p.853–859.
469. **Nathan C., 2002.** Points of control in inflammation. *Nature*, vol. 420, no 6917, p. 846-852. Doi: 10.1038/nature01320
470. **Nathan C., 2006.** Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews immunology*, vol 6, no 3, p. 173-182. Doi : 10.1038/nri1785
471. **Narasimha M. K., Fazilath U., Soumya K., Srinivas C., 2015.** Antibacterial activity and phytochemical screening of aqueous and methanolic extracts of pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel against bacterial wilt of tomato. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, vol 3, no 6, p. 1786-1792.
472. **Negi P., Jayaprakasha J., 2003.** “Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts,” *Journal of Food Science*, Vol. 68, No. 4, 2003, pp. 1473-1477. [doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb09669.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09669.x)
473. **Nelson K.J., Knutson S.T., Soito L., Klomsiri C., Poole L.B., Fetrow J.S., 2011.** Analysis of the peroxiredoxin family: using active site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins*, vol 79, no 3, p. 947-964. Doi: 10.1002/prot.22936
474. **Nemmar A., Subramaniyan D., Ali B.H., 2012.** Protective effect of curcumin on pulmonary and cardiovascular effects induced by repeated exposure to diesel exhaust particles in mice. *PLoS One*, vol 7, no 6, e39554.
475. **Neve J., 1991.** Methods in determination of selenium states. *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease*, vol. 5, no 1, p. 1-17.
476. **Nirmal-Sharma Bist H.-S., 2005.** Evaluation of some pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars under mid hills of Himachal Pradesh. *Acta Horticulturae*, vol 696, p.103–105
477. **Neurath A.R., Strick N., LI Y. Y., Debnath A.K., 2004.** *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infectious Diseases*, vol 1056, no 1, p. 311-327.

478. **Nimse S.B., Pal D., 2015.** Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, vol. 5, no 35, p. 27986-28006. Doi: <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
479. **Nishikawa M., Hashida M., Takakura Y., 2009.** Catalase delivery for inhibiting ROS mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced drug delivery reviews*, vol 61, no 4, p. 319–326. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.01.001>
480. **Nourshargh S., Alon R., 2014.** Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, vol 41, no 5, p. 694-707. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
481. **Nuncio-Jáuregui N., Calín-Sánchez A., Carbonell-Barrachina A., Hernández F. C. A., 2014.** Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. *Scientia Horticulturae*, vol 165, p. 181–189.
482. **Nuncio-Jáuregui N., Munera-Picazo S., Calín-Sánchez Á., Wojdyło A., Hernández F., Carbonell-Barrachina Á.A., 2015.** Bioactive compound composition of pomegranate fruits removed during thinning. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol 37, p. 11-19.
483. **OECD. 2008.** OECD Guideline for the testing of chemicals No. 425: Acute Oral Toxicity– Up-and-Down-Procedure (UDP), 8 pp. Paris, France
484. **Okamoto T., Akuta T., Tamura F., Van Der Vliet A., Akaike T., 2004.** Molecular Mechanism for Activation and Regulation of Matrix Metalloproteinases during Bacterial Infections and Respiratory Inflammation. *Biological Chemistry*, Vol.385, No.11, pp.997-1006.
485. **Olajide OA, Awe SO, Makinde JM, Ekhelar AI, Olusola A, Morebise O, Okpako DT., 2000.** Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology* vol 71, no 1-2, p. 179-186. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00200-7)
486. **Olaleye, M. T., Amobonye, A. E., Komolafe, K., & Akinmoladun, A. C., 2014.** Protective effects of *Parinari curatellifolia* flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats. *Saudi journal of biological sciences*, vol 21, no 5, p. 486-492.
487. **Olson J.A., Krinsky N.I., 1995.** Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *The FASEB Journal*, vol 9, no 15, p. 1547-1550.
488. **Orak H.H., Yagar H., Isbilir S.S., 2012.** Comparison of antioxidant activities of juice, peel, seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total

- phenolic, Tannin, anthocyanins and flavonoids contents. Food Science and Biotechnology, vol 21, p. 373-387. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0049-6>
489. **Origassa C.S.T., Câmara N.O.S., 2013.** Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury. World journal of hepatology, vol 5, no 10, p. 541.
490. **Otterbein L.E., Zuckerbraun B.S., 2005.** Heme oxygenase: the elegant orchestration of its products in medicine. Nova Publishers.
491. **Ozgen M., Durgac C., Serce S., Kaya C., 2008.** Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. Food Chemistry vol 111, no 3, p. 703-706. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.043>
492. **Ozkal, N, Dinc S., 1994.** Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum* L.) peels from the standpoint of pharmacy. Ankara University Eczacilik Fak Derg, vol 22, p.21-29.
493. **Ozougwu, J. C., 2016.** The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. International Journal of research in pharmacy and biosciences, vol 1, no 6, p. 1-8.
494. **Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N., 2008.** Antioxidant activity of Smilax excelsa L. leaf extracts. Food Chemistry, vol 110, no 3, p. 571-583.
495. **Padayatty S. J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J. H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M., 2003.** Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. Journal of the American college of Nutrition, vol 22, no 1, p. 18-35. Doi: <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>
496. **Padda, M. S., & Picha, D. H., 2007.** Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. Journal of food science, vol 72, no 7.
497. **Pande G., Akoh C.C., 2016.** Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.). In Nutritional Composition of Fruit Cultivars. Chapter 26, p. 667-689.
498. **Papp L.V., Lu J., Holmgren A., khanna K.K., 2007.** From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. Antioxidants & redox signaling, vol 9, no 7, p. 775-806. Doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1528>
499. **Patil, K.R., & Patil, C. R., 2017.** Anti-inflammatory activity of bartogenic acid containing fraction of fruits of Barringtonia racemosa Roxb. in acute and chronic animal models of inflammation. Journal of traditional and complementary medicine, vol 7, no 1, p. 86-93.
500. **Prasetyastuti, Adhi Tanjung Laksono, Ricky Taufiqurrohman, Tantra Dewi Rahardyanti, Gandhi Anandika Febryanto, Yan Mahmud Fau, Sri Herwiyanti,**

- Ngadikun and Sunarti. Asian, 2017. Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice Improves Liver Damage in Carbon Tetrachloride-induced Rats**, Journal of Biochemistry, vol 12, no 3, p. 79-84.
501. **Peter AA, Casimir IO., 2010.** Hepatoprotective effect of the solvent fractions of the stem of *Hoslundia opposita* Vahl (Lamiaceae) against carbon tetrachloride–and paracetamol-induced liver damage in rats. *Int. J. Green. Pharm.*, Vol 4,p. 54-58
502. **Peng Q., Li K., Sacks S.H., Zhou W., 2009.** The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflammation & Allergy- Drug Targets*, vol 8, no 3, p. 236-246.
503. **Perretti M., Ahluwalia A., 2000.** The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. *Microcirculation*, vol 7, no 3, p.147-161. Doi : <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2000.tb00117.x>
504. **Pereira-Leite C, Nunes C, Jamal SK, Cuccovia IM, Reis S., 2016.** Nonsteroidal Anti-Inflammatory Therapy: A Journey Toward Safety. *Medicinal Research Reviews*, vol 37, no 4, p. 802–859. <http://dx.doi.org/10.1002/med.21424>
505. **Pietta P. G., 2000.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, vol 63, no 7, p. 1035-1042.
506. **Perze-Vicente, A., Izquierdo, A. and Garcia-Viguera, C., 2002.** *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins and vitamin C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol 50, p.2308-2312.
507. **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., 2002.** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, vol 16, p. 233-239.
508. **Pirinçioğlu, M., Kızıl, G., Kızıl, M., Kanay, Z., & Ketani, A. (2014).** The protective role of pomegranate juice against carbon tetrachloride–induced oxidative stress in rats. *Toxicology and industrial health*, vol 30, no 10, p. 910-918..
509. **Pisoschi A. M., Pop A., 2015.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, vol 97, p. 55-74
510. **Polagruto J. A., Schramm D.D., Wang-Polagruto, J. F., Lee, L., Keen, C. L., 2003.** Effects of flavonoid-rich beverages on prostacyclin synthesis in humans and human aortic endothelial cells: association with ex vivo platelet function. *Journal of medicinal food*, vol 6, no 4, p. 301-308.
511. **Popa-Wagner A., Mitran S., Sivanesan S., Chang E., Buga A.-M., 2013.** “ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol 2013, p. 1-14.

512. **Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G., 2004.** Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, vol 142, no 2, p. 331-338. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705650>
513. **Prabhakar O., 2013.** “Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats,” *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol 386, no 8, pp. 705–710.
514. **Prior R.L., Gu L., 2005.** Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, vol 66, no 18, p. 2264-2280.
515. **Prior R. L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt W., Mainland C.M., 1998.** Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol 46, p. 2686–2693.
516. **Puerto-Galán L., Pérez-Ruiz J.M., Ferrández J., Cano B., Naranjo B., Nájera V.A., Gonzalez M., Lindahl A.M., Cejudo F.J., 2013.** Overoxidation of chloroplast 2-Cys peroxiredoxins: balancing toxic and signaling activities of hydrogen peroxide. *Frontiers in Plant Science*, vol 4, no 310. Doi: <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00310>
517. **Qnais E.Y., Elokda A.S., Abu Ghalyun Y.Y., Abdulla F.A., 2007.** Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of *Punica granatum* (Pomegranate) Peels. *Pharmaceutical Biology*, vol 45, no 9, p. 715–720.
518. **Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.C., Bailleul F., Trotin F., 2000.** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 72, no 1-2, p. 35-42. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00196-3)
519. **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique – 15, quai Anatole, France- Paris 7^e. p. 636.
520. **Rababah T.M., Ereifej K.I., Howard L., 2005.** Effect of ascorbic acid and dehydration on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol 53, p. 4444–4447.
521. **Rabeta MS, Nur Faraniza R., 2013.** Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *International Food and Research Journal*, vol 20, no 4, p.1691-1696.

522. **Radunić M., Špika M.J., Ban S. G., Gadže J., Díaz-Pérez J.C., MacLean D., 2015.** Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. Food chemistry, vol 177, p. 53-60.
523. **Raffo A, La Malfa G, Fogliano V, Madani G, Quaglia G., 2006.** Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. *Naomi* F1). Journal of Food Composition and Analysis, vol 19, p. 11-19.
524. **Rahman T., Hosen I., Islam M.T., Shekhar H.U., 2012.** Oxidative stress and human health. Advances in Bioscience and Biotechnology, vol 3, no 7, pp. 997. Doi : [10.4236/abb.2012.327123](https://doi.org/10.4236/abb.2012.327123)
525. **Rahmani A.H., Alsahli M.A., Almatroodi S.A., 2017.** Active Constituents of Pomegranates (*Punica granatum*) as Potential Candidates in the Management of Health through Modulation of Biological Activities. Pharmacognosy Journal, vol. 9, no 5, p. 689-695
526. **Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E.N., Lakshminarasaiiah U., Gopas J., Nishigaki I., 2014.** Antioxidants and human diseases. Clinica Chimica Acta, vol 436, p. 332-347. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
527. **Rana T.S., Narzary D., Ranade S.A., 2010.** Systematics and taxonomic disposition of the genus Punica L. Pomegranate. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, vol 4, p. 19-25.
528. **Rankin J.A., 2004.** Biological mediators of acute inflammation. AACN Advanced Critical Care, vol 15, no 1, p. 3-17.
529. **Ranilla L.G., Genovese M.I., Lajolo F.M., 2007.** Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol 55, p. 90–98.
530. **Rajasekar D., Akoh C.C., Martino K.G., MacLean D.D., 2012.** Physico-chemical characteristics of juice extracted by blender and mechanical press from pomegranate cultivars grown in Georgia. Food Chemistry, vol 133, no 4, p.1383–1393.
531. **Rapisarda P., Tomaino A., Lo Cascio R., Bonina F., De Pasquale A., Saija A., 1999.** Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol 47, no 11, p. 4718-4723.
532. **Reagan L.P., Magariños A.M., McEwen B.S., 1999.** “Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats,” Annals of the New York Academy of Sciences, vol 893, no 1, pp. 126–137.

533. **Rhee S.G., 2016.** Overview on peroxiredoxin. *Molecules and Cells*, vol 39, no 1, p. 1–5. Doi: <http://doi.org/10.14348/molcells.2016.2368>
534. **Rhee S.G., Kang S.W., Jeong W., Chang T-S., Yang K-S., Woo H.A., 2005.** Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current opinion in cell biology*, vol 17, no 2, p. 183-189. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.02.004>
535. **Rhen T., Cidlowski J.A., 2005.** Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, vol 353, no 16, p.1711–1723.
536. **Riccardi C., Zollo G.N., Bruscoli S., Bartoli A., D'Adamio F., Cannarile L., Delfino D., Ayroldi E., Migliorati G., 2000.** Glucocorticoid hormones in the regulation of Cell. *Therapie*, vol 55, p. 165-169.
537. **Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, vol 20, no 7, p. 933-956. Doi : [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
538. **Richard M.J., Belleville F., Chalas J., Ceballos-Picot I., Vitoux D., Boyer M.J., Chaudière J., Favier A., 1997.** Les glutathions peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique. In *Annales de biologie clinique*, vol 55, no 3, p. 195-207.
539. **Richard A. Dixon, De-Yu Xie and Shashi B. Sharma., 2005.** Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research. *New Phytologist*, vol. 165, pp. 11.
540. **Rizvi S., Raza S.T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S., Mahdi F., 2014.** The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, vol 14, no 2, p. e157.
541. **Rogério A.P., Fontanari C., Melo M.C., Ambrosio S.R., Souza G.E., Pereira P.S., Faccioli L.H., 2006.** Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol 58, no 9, p. 1265-1273
542. **Roopalatha U.C., Nair V.M., 2013.** Phytochemical analysis of successive re extracts of the leaves of *Moringa Oleifera* Lam. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol 5, no 3, p. 629-634.
543. **Rosenberg H.F., Dyer K.D., Foster P.S., 2013.** Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews of Immunology*, vol 13, no 1, p. 9–22. Doi : 10.1038/nri3341

544. **Rosenblat M., Aviram M., 2006.** Antioxidative Properties of Pomegranate: In Vitro Studies. In *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*; Seeram, N. P., Heber, D., Eds.; Taylor and Francis Group: New York, pp 31–43.
545. **Rummun N., Somanah J., Ramsaha S., Bahorun T., Neergheen-Bhujun V.S., 2013.** Bioactivity of nonedible parts of *Punica granatum* L.: a potential source of functional ingredients. *International journal of food science*, vol 2013.
546. **Ruis A. R., 2015.** Pomegranate and the Mediation of Balance in Early Medicine. *Gastronomica: The Journal of Critical Food Studies*, vol 15, no 1, p. 22-33. DOI: 10.1525/gfc.2015.15.1.22
547. **Saad H., 2013.** Développement de bio-composites à base de fibres végétales et de colles écologiques. Thèse de doctorat. Université de Pau et des Pays de l'Adour
548. **Saad H, Charrier-El Bouhtoury F, Pizzi A, Rode K, Charrier B, Ayed N., 2012.** Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products* vol 40, p. 239-246. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.038>
549. **Sajjad W, Sohail M, Ali B, Haq A, Din G, Hayat M, Khan I, Ahmad M, Khan S. 2015.** Antibacterial activity of *Punica granatum* peel extract. *Mycopath*, vol 13, p. 105-111.
550. **Sakamoto T., Maebayashi K., Nakagawa Y., Imai H., 2014.** Deletion of the four phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes accelerates aging in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells*, vol 19, no 10, p. 778-792.
551. **Saleh H., Golian A., Kermanshahi, H., Mirakzahi M.T., 2017.** Effects of dietary α -tocopherol acetate, pomegranate peel, and pomegranate peel extract on phenolic content, fatty acid composition, and meat quality of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, vol 45, no 1, p. 629-636.
552. **Salwe K. J., Sachdev D. O., Bahurupi Y., Kumarappan M., 2015.** Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. *Journal of natural science, biology, and medicine*, vol 6, p. 56–62.
553. **Sandilands E.A., Bateman D.N., 2016.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Medicine*, vol 44, no 3, p. 185-186.
554. **Santangelo C., Varì R., Scazzocchio B., Di Benedetto R., Filesi C., Masella R., 2007.** Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, vol 43, no 4, p. 394–405.

555. **Sarkhosh A., Zamani Z., Fatahi R., Ranjbar H., 2009.** Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers, *Scientia Horticulturae*, vol 121, p. 313–319.
556. **Sarada K, Jothibai MR, Mohan VR. 2012.** Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extracts of *Naringi crenulata* (Roxb) Nicolson against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol 3, no 3, p. 874-880
557. **Saxena A., Vikram N.K., 2004.** Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol 10, p. 369–378.
558. **Seeram N.P., Lee R., Hardy M., Heber D., 2005.** Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*, vol 41, p. 49-55
559. **Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D., 2005.** In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid, and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* vol 16, no 6, p.360-367. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.006>
560. **Seibert K., Zhang Y., Leahy K., Hauser S., Masferrer J., Isakson P., 1997.** Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. In *Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury* 2, p. 167-170. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5325-0_24
561. **Sepulveda E., Saenz C., Pena A., Robert P., Bartolome, B., Gomez-Cordoves C., 2010.** Influence of the genotype on the anthocyanin composition, antioxidant capacity and color of Chilean pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *Chilean Journal of Agricultural Research*, vol 70, no 1, p. 50-57.
562. **Sergent T., Piront N., Meurice J., Toussaint O., Schneider Y. J., 2010.** Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium. *Chemico-Biological Interactions*, vol 188, p. 659–667. Doi:10.1016/j.cbi.2010.08.007
563. **Sellappan S., Akoh C.C., Krewer G., 2002.** Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol 50, p.2432–2438.

564. **Serhan C.N., 2014.** Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, vol 510, no 7503, p. 92-101
565. **Schubert S.Y., Lansky E.P., Necman I., 1999.** Antioxidant and Eicosanoid Enzyme Inhibition Properties of Pomegranate Seed Oil and Fermented Juice Flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.66, No.1, pp.11-17.
566. **Schwartz E, Tzulker R, Glazer I, Bar-Ya'akov I, Wiesman Z, Tripler E, Bar-Ilan I, Fromm H, Borochoy-Neori H, Holland D, Amir R., 2009.** Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 9197–9209
567. **Shah M., Shah S., Patel M., 2011.** Review On: The Aspects of *Punica granatum*. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*, vol 1, no 3, p. 154-159.
568. **Shamri R., Xenakis J.J., Spencer L. A., 2011.** Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and Tissue Research*, vol 343, no 1, p. 57–83.
569. **Sharapov M.G., Ravin V.K., Novoselov V.I., 2014.** Peroxiredoxins as Multifunctional Enzymes, **Molecular Biology**, vol 48, no 4, p. 520-545. Doi: <https://doi.org/10.1134/S0026893314040128>
570. **Sharififar F, Khazaeli P, Alli N, Talebian E, Zarehshahi R, Amiri S., 2012.** Study of antinociceptive and anti-inflammatory activities of certain Iranian medicinal plants. *Journal of International Ethnopharmacology*, vol 1, no 1, p. 19-24. <http://dx.doi.org/10.5455/jice.20120227104636>
571. **Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessaraki M., 2012.** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, vol 2012, pp.26. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>
572. **Shaygannia E., Bahmani M., Zamanzad B., Rafieian-Kopaei M., 2016.** A review study on *Punica granatum* L. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, vol 21, no 3, p. 221-227.
573. **Sherwood E.R., Toliver-kinsky T., 2004.** Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, vol 18, no 3, p. 385-405. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2003.12.002>
574. **Shi G., Morrell C.N., 2011.** Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thrombosis research*, vol 127, no 5, p.387-390. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.10.019>

575. **Shiban, M. S., Al-Otaibi, M. M., Al-Zoreky, N. S., 2012.** Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*, vol 3, no 07, pp. 991.
576. **Shon M.Y., Kim T. H., Sung N.J., 2003.** Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food chemistry*, vol 82, no 4, p. 593-597.
577. **Shukla M., Gupta K., Rasheed Z., Khan K.A., Haqqi T.M., 2008.** Bioavailable Constituents/metabolites of Pomegranate (*Punica granatum* L.) preferentially Inhibit COX2 Activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE2 Production in Human Chondrocytes in vitro. *Journal of Inflammation (Lond)*, vol.5, No.1, pp.9-19.
578. **Shulman Y., Fainberstein L., Lavee S., 1984.** Pomegranate fruit development and maturation. *Journal of Horticultural Science*, vol 59, no 9, p.265–274
579. **Sies H., Stahl W., 1995.** Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, vol 62, no 6, p. 1315S-1321S. Doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1315S>
580. **Silva J.P., Coutinho O.P., 2010.** Free radicals in the regulation of damage and cell death--basic mechanisms and prevention. *Drug discoveries & therapeutics*, vol 4, no 3, p.144-167.
581. **Silva-Adaya D., Gonsebatt M.E., Guevara J., 2014.** “Thioredoxin System Regulation in the Central Nervous System: Experimental Models and Clinical Evidence,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol 2014, pp.13. Doi: 10.1155/2014/590808
582. **Simons S.S., 2008.** What goes on behind closed doors: physiological versus pharmacological steroid hormone actions, *Bioessays*, vol 30, no 8, p.744–756
583. **Singh M., Jha A., Kumar A., Hettiarachchy N., Rai, A. K.,Sharma D., 2014.** Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. *Journal of food science and technology*, vol 51, no 9, p.2070-2077.
584. **Singleton V.L., Rossi J.L., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol 16, p.144–158
585. **Srivastava A., Shivanandappa T., 2010.** Hepatoprotective effect of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food Chemistry*, vol 118, no 2, p. 411-417.

586. **Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J., 2015.** Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*, vol 16, p.24673-24706.
587. **Smith R.E., 2014.** Pomegranate: Botany, Postharvest Treatment, Biochemical Composition and Health Effects. In: *Food and Beverage Composition and Health*. Nova Science Publisher, p. 1- 173.
588. **Soehnlein O., Lindbom, L., 2010.** Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, vol 10, no 6, p. 427–439. Doi: 10.1038/nri2779.
589. **Soerensen J., Jakupoglu C., Beck H., Förster H., Schmidt J., Schmahl W., Schweizer U., Conrad M., Brielmeier, M., 2008.** The role of thioredoxin reductases in brain development. *PLoS One*, vol 3, no 3, pp. e1813. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001813>
590. **Solomon A., Golubowicz S., Yablowicz Z., Grossman S., Bergman M., Gottlieb H.E., Altman A., Kerem Z., Flaishman M.A., 2006.** Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol 54, p.7717–7723.
591. **Son Y., Lee J.H., Chung H.T., Pae H.O., 2013.** Therapeutic roles of heme oxygenase-1 in metabolic diseases: curcumin and resveratrol analogues as possible inducers of heme oxygenase-1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol 2013, pp. 12. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/639541>
592. **Soni S., Lambole V., Modi D., Shah B., 2012.** Phytopharmacology of *Punica granatum* Linn - A Review, *Pharma Science Monitor*, vol 3, no 4, p. 2222-2245.
593. **Souleman A.M., Ibrahim G.E., 2016.** Evaluation of Egyptian pomegranate cultivars for antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, vol 15, no 3, p. 143-149.
594. **Sourabié, T. S., Nikiéma, J. B., Guissou, I. P., Nacoulma, O. G., 2012.** Etude comparée des effets anti-hépatotoxiques d'extraits d'*Argemone mexicana* L. (Papaveraceae), une plante utilisée dans le traitement traditionnel de la jaunisse au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, vol 6, no 3, p. 1139-1147
595. **Spencer L. A., Szela C. T., Perez S. A., Kirchhoffer C. L., Neves J. S., Radke A. L., Weller P.F., 2009.** Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and

- immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *Journal of Leukocyte Biology*, vol 85, p. 117–123. Doi : <https://doi.org/10.1189/jilb.0108058>
596. **Sreekumar S., Sithul H., Muraleedharan P., Azeez J.M., Sreeharshan S., 2014.** Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *BioMed Research International*, vol 2014, p. 1-12. doi:10.1155/2014/686921
597. **Stover E., Mercure E.W., 2007.** The pomegranate: A new look at the fruit of paradise. *Hortscience*. vol 42, no 5, p.1088-1092.
598. **Stahl W., Sies H., 2003.** Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, vol 24, no 6, p. 345-351. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
599. **Su X., Sangster M. Y., D'Souza D. H., 2010.** In vitro effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on foodborne viral surrogates. *Foodborne Pathogens and Disease*, vol 7, no 12, p.1473-1479.
600. **Sumagin R., Sarelius I.H., 2010.** *Intercellular adhesion molecule-1 enrichment near tricellular endothelial junctions is preferentially associated with leukocyte transmigration and signals for reorganization of these junctions to accommodate leukocyte passage.* *Journal of Immunology*, vol 184, p. 5242–5252.
601. **Swain SD, Rohn TT, Quinn MT., 2002.** Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal*, vol 4, no 1, p. 69-83.
602. **Su X., Sangster M.Y., D'Souza D.H., 2010.** In vitro Effects of Pomegranate Juice and Pomegranate Polyphenols on Foodborne Viral Surrogates. *Foodborne Pathogens and Disease*, vol 7, no 12, p.1473-1479.
603. **Sultana B., Anwar F., Asi M.R., Chatha S. A. S., 2008.** Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas y aceites*, vol 59, no 3, p. 205-217.
604. **Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A., 2008.** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanin, betalains and carotenoids. *Plant Journal*, vol 54, p. 733–749. doi: [10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x)
605. **Tanigawa S., Fujii M., Hou D.-X., 2007.** Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radical Biology and Medicine*, vol 42, no 11, pp. 1690–1703.
606. **Tehranifar A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Vazifeshenas, M. R., 2010.** Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, vol 126, no 2, p. 180-185.

607. **Telang P.S., 2013.** Vitamin C in dermatology. Indian dermatology online journal, vol 4, no 2, pp. 143.
608. **Tezcan F., Gultekin-Ozguven M., Diken T., Ozcelik B., Erim F.B., 2009.** Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. Food Chemistry, vol 115, p. 873-877.
609. **Teixeira da Silva J.A., Rana T.S., Narzary D., Verma N., Meshram D.T., Ranade S. A., 2013,** Pomegranate biology and biotechnology: a review. Scientia Horticulturae, vol 160, p. 85–107
610. **Tiwari S., Ndisang J.F., 2014.** Heme oxygenase system and hypertension: a comprehensive insight. Current pharmaceutical design, vol 20, no 9, p. 1354-1369
611. **Toro J., Rodrigo R., 2009.** Oxidative stress: basic overview. Oxidative stress and antioxidants-Their role in human disease. New York: Nova Biomedical Books, p. 1-24.
612. **Toor R.K., Savage G.P., Lister C.E., 2006.** Seasonal Variations in the antioxidant composition of greenhouse-grown Tomatoes. Journal of Food Composition and Analysis vol 19, no 1, p. 1-10. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.11.008>
613. **Tsuda T., 2012.** Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. Molecular Nutrition and Food Research, vol 56, p. 159–170. doi: [10.1002/mnfr.201100526](https://doi.org/10.1002/mnfr.201100526)
614. **Turfan Ö., Türkyılmaz M., Yemiş O., Özkan M., 2011.** Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. Food Chemistry, vol 129, no 4, p. 1644-1651
615. **Türk G., Sönmez M., Aydın M., Yüce A., Gür S., Yüksel M., Aksu E.H., Aksoy H., 2008.** Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. Clinical nutrition, vol 27, no 2, p. 289-296.
616. **Turkmen N, Sari F, Velioglu YS., 2006.** Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry, vol 99, p. 838-841.
617. **Turrens J.F., 2010.** *Superoxide Dismutases* and catalases. In *Comprehensive Toxicology*. (Charlene McQueen, Ed.), Biotransformation. Oxford: Elsevier, vol 4, pp. 219-227.
618. **Tzulker R., Glazer I., Bar-Ilan I., Holland D., Aviram M., Amir R., 2007.** Antioxidant activity, polyphenol content and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol 55, p. 9559–9570.

619. **Uddin R., Saha M.R., Subhan N., Hossain H., Jahan I.A., Akter R., Alam A., 2014.** HPLC-analysis of polyphenolic compounds in *Gardenia jasminoides* and determination of antioxidant activity by using free radical scavenging assays. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* , vol 4, no 3, p. 273-281.
620. **Uma C, Gomathi D, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Palaniswamy M., 2012.** Production and properties of invertase from a *Cladosporium cladosporioides* in SmF using pomegranate peel waste as a substrate. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol 2, no 2, p. S605-S611. Doi: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60282-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60282-2)
621. **Valero D., Mirdehghan S. H., Sayyari M., Serrano M., 2015.** Vapor treatments, chilling, storage, and antioxidants in pomegranates. In *Processing and Impact on Active Components in Food*. Chapter 23, p. 189-196.
622. **Valero C., Ruiz-Altisent, M., 2000.** Design guidelines for a quality assessment system of fresh fruits in fruit centers and hypermarkets. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, vol II, p. 1-20.
623. **Veres B., 2012.** Anti-inflammatory role of natural polyphenols and their degradation products. In *Severe Sepsis and Septic Shock-Understanding a Serious Killer*. InTech, p. 279-410.
624. **Vinegar R., Schreiber W., Hugo R., 1969.** Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol 166, no 1, p. 96-103.
625. **Viswanath P., Al-Bakri A.N., Nadaf S.K., Amal K., 1999.** Correlations and variability in fruit characters of pomegranate. Recent advances in management of arid ecosystem. In: Faroda, A.S., Joshi, N.L., Kathju, S. (Eds.), *Proceedings of a Symposium Held in India, March 1997*. (8 ref.), pp. 361– 364.
626. **Wagner H., Bladt S., 1996.** *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. Edit. Springer 2nd. Munich, p. 384.
627. **Wald E., 2009.** *Le grenadier (Punica granatum L.): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes*. Doctorat de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy, 1.
628. **Wallace T.C., 2011.** Anthocyanins in cardiovascular disease. *Advances in Nutrition*, vol 2, p. 1–7. doi: [10.3945/an.110.000042](https://doi.org/10.3945/an.110.000042)
629. **Wang L.S., Stoner G.D., 2008.** Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett*, vol 269, p. 281–290. doi: [10.1016/j.canlet.2008.05.020](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.020)

630. **Wang R., Ding Y., Liu R., Xiang L., Du L., 2010.** Pomegranate, Bioactivities and Pharmacokinetics. *Fruits, Vegetables and Cereal Science and Biotechnology*, vol 4, no 2, p. 77-87.
631. **Wang B. S., Leu K. L., Huang G. J., Yeh C.F., Tai H.M., Ho W. Y., Huang, M. H., 2014.** Protective effects of an aqueous *Pericarpium granati* extract against inflammatory damage in mice. *Journal of Functional Foods*, vol 9, p. 183-191.
632. **Wang Z., Pan Z., Ma H., Atungulu G.G., 2011.** Extract of phenolics from pomegranate peels. *The Open Food Science Journal*, vol 5, p. 17-25. Doi : <http://dx.doi.org/10.2174/1874256401105010017>
633. **Weerakkody, P., Jobling, J.I., María, M.V., Rogers, G., 2010.** The effect of maturity, sunburn and the application of sunscreens on the internal and external qualities of pomegranate fruit grown in Australia. *Scientia Horticulturaz*, vol 124, p. 57–61.
634. **Weill B., Batteux F., 2003.** Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur.
635. **Wetzstein H.Y., Ravid N., Wilkins E., Martinelli A.P., 2011.** A morphological and histological characterization of bisexual and male flower types in pomegranate, *Journal of the American society of Horticultural science*, vol 136, p. 83–92.
636. **Willis RB, Allen PR. 1998.** An improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *The Analyst*, vol 123, p. 435–439.
637. **Winter C.A, Risley E.A, Nuss G.W., 1962.** Carrageenin-induced edema in hand paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, vol 111, no 3, p. 544-547. <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27849>
638. **Wissam Z., Ghada B., Wassim A., Warid K., 2012.** Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol 4, no 3, p. 675-682.
639. **Woodfin A., Voisin M. B., Beyrau M., Colom B., Caille D., Diapouli F. M., Nash G.B., Chavakis T., Albelda S.M., Rainger GEd., Meda P., Imohf B.A., Nourshargh S., 2011.** The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature immunology*, vol 12, no 8, pp. 761.
640. **Yin Z.Z., Jin H.L., Yin X.Z., Li T.Z., Quan J.S., Jin Z.N., 2000.** Effect of *Boschniakia rossica* on expression of GST-P, p53 and p21 ras proteins in early stage of chemical hepatocarcinogenesis and its anti-inflammatory activities in rats. *World Journal of Gastroenterology*, vol 6, p.812–818.

641. **Zahin M., Aqil F., Ahmad I., 2010.** Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol 703, no 2, p. 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.08.001>
642. **Zaki S.A., Abdelatif S.H., Abdelmohsen N.R., Ismail F.A., 2015.** Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Pomegranate Peels. *International Journal of Food Engineering*, vol 1, no 2.
643. **Zarei M., Azizi M., Bashir-Sadr Z., 2011.** Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit during ripening. *Fruits*, vol 66, no 2, p. 121-129.
644. **Zaouay F., Mena P., Garcia-Viguera C., Mars M., 2012.** Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, vol 40, p. 81-89.
645. **Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH., 2014.** Potent health effects of pomegranate. *Advanced Biomedical Research*, vol 3, pp. 100. Doi: <http://dx.doi.org/10.4103/2277-9175.129371>
646. **Zhen, M. C., Wang, Q., Huang, X. H., Cao, L. Q., Chen, X. L., Sun, K., Liu Y-J., Li W.,Zhang, L.J., 2007.** Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride–induced hepatic fibrosis. *The Journal of nutritional biochemistry*, vol 18, no 12, p. 795-805. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.12.016>
647. **Zhang Y, Butelli E, De Stefano R, Schoonbeek H, Magusin A, Pagliarani C, Wellner N., Hill L., Orzaez D., Granell A., Jones DGJ., Martin C., 2013.** Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Current Biology*, vol 23, p. 1094–1100. doi: [10.1016/j.cub.2013.04.072](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.072)
648. **Zhao G.R., Xiang Z.J., Ye T.Y., Yuan Y.J., Guo Z.X., 2007.** Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chemistry*, vol 99, no 4, p. 767-774.
649. **Zhu Z.Z., Ma K.J., Ran X., Zhang H., Zheng C.J., Han T., Zhang Q.Y., Qin L.P., 2011.** Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 133, no 3, p. 1126-1131. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.042>

650. **Zhuang H., Du J., Wang, Y., 2011.** Antioxidant capacity changes of 3 cultivar Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and corresponding wines. *Journal of Food Science*, vol 76, p. C606-C611.
651. **Ziyan L., Yongmei Z., Nan Z., Ning T., Baolin L. 2007.** Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta medica*, vol 73, p. 221–226.

Publications et Communications

Publications Internationales

In vivo anti-inflammatory activity and chemical composition of Algerian pomegranate (*Punica granatum L.*).

Nor El Houda Douaouri and Noureddine Djebli.

International Journal of Biosciences. (2018) Vol. 12(2), 76-90.

Communications

1. 7^{èmes} Journées de La Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mostaganem, du 26 au 27 Avril, 2017.
 - **Participation** : Communication orale
 - **Intitulée** : « Etude de quelques activités biologiques de l'écorce de fruit de *Punica granatum*. Étude *in vitro* et *in vivo* »
2. 1^{er} séminaire « Phytothérapie et santé », Université de Blida 1. Du 16, 17 et 18 mai 2017
 - **Participation** : Communication orale
 - **Intitulée** : « Evaluation des activités antioxydantes et anti-inflammatoires du fruit de *Punica granatum* - Etude *in vitro* et *in vivo* »
3. The 4th International Congress of plants biodiversity held at Marrakach from 5th to 8th October 2017
 - **Participation** : Communication affichée
 - **Intitulée** : « Histological study on the protective effect of pomegranate juice on hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats »