

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaia



**Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie Physico-Chimique**

Mémoire de fin d'études : en vue de l'obtention du
diplôme de MASTER en sciences de la nature et de la vie

Option : Pharmaco toxicologie

Thème :

**Etude comparative de méthodes
conventionnelles d'extraction de composés
phénoliques de punica granatum**

Présenté par :

M^{lle} AIT OTMANE Kenza & M^{lle} AIT SOUKI Salima

Soutenu le : 10 septembre 2023

Devant le Jury

M. AMIROUCHE A.	MCA	Président.
M ^{me} ABDELOUHAB K.	MCB	Encadrant.
M. BRIBI N.	MCA	Examineur.

Année universitaire 2022 / 2023

DÉDICACES

À ma très chère mère [Khadija]

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point te remercier comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

À mon très cher père [Therif]

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager que ce travail te traduise ma gratitude et mon affection.

À mon cher frère [Hamza]

À mes sœurs

Pour leurs soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

À mes amis

Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

KENZA

DÉDICACES

*À ma très chère mère Zahera, Pour son amour, son
courage et ses sacrifices.*

*À mon très cher père Asi, pour son soutien, son affection
et sa confiance*

À ma chère tante Saida

À ma chère sœur

À tous mes amis surtout ma chère Lilia

SALIMA

REMERCIEMENTS

*Louange à Dieu, le miséricordieux, sans Lui rien n'aurait
pu être.*

*Un merci particulier à nos chers parents, pour leur amour, leurs
sacrifices et leur patience.*

*Nous tenons à remercier vivement Madame **ABDELOUHAB K**, pour
son encadrement, pour sa disponibilité, ses
orientations, ses précieux conseils et ses encouragements qui nous
ont permis de mener à bien ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membre du jury M. **AMIROUCHE A.** et M. **BRIBI N.**
pour
avoir pris de leur temps et accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions également les techniciennes de laboratoires au bloc 12, M^{me} Mammas H, M^{me}
Saadi-Ahmed L, M^{me} IMADALOU N et M^{me} Mahdi T. pour leur assistance technique.*

*Un énorme merci à nos familles et amis pour leurs éternel soutien et
la confiance qu'ils ont eu en nos capacités.*

KENZA & SALIMA

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction01

Partie théorique

I. Généralités sur le grenadier

- 1. Historique02
- 2. Le grenadier (*Punica granatum*)02
- 3. Description botanique et répartition géographique02
- 4. Nomenclature et classification botanique03
- 5. Utilisation de la grenade en médecine traditionnelle04
- 6. Composition chimique des différents organes du grenadier05

II. Les composés phénoliques

- 1. Définition07
- 2. Classification des polyphénols07
 - 2.1. Acides-phénoliques08
 - 2.2. Flavonoïdes09
 - 2.3. Tannins10
- 3. Activités biologiques des polyphénols10
 - 3.1. Activité antioxydante10
 - 2.3. Activité anti-inflammatoire10
 - 3.3. Activité antimicrobienne11

III. Méthodes d'extraction conventionnelles

- 1. Infusion.....12
- 2. Macération.....12
- 3. Soxhlet.....12
- 4. Autres méthodes conventionnelles :
 - 4.1. Digestion14
 - 4.2. Décoction14

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Matériel	15
1.1 Matériel végétal.....	15
1.2 Réactif et appareils	15
2. Méthodes	16
2.1. Préparation des extraits	16
2.1.1. Extraction par infusion	16
2.1.2. Extraction par Macération.....	16
2.1.3. Extraction par Soxhlet.....	16
2.2. Dosage des composés phénoliques	17
2.2.1. Dosage des polyphénols totaux	17
2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	17
2.2.3. Dosages des tanins condensés	18
2.3. Etude de l'activité antioxydant.....	18
2.3.1. Effet du piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•).....	18
2.3.2. Effet de piégeage du radical ABTS•+	19
2.3.3. Évaluation du potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP).....	19
2.4. Analyse statistique.....	20

II. Résultat et discussion

1. Etude phytochimique de la pelure de la grenade.....	21
1. 1. Rendement de l'extraction.....	21
1. 2. Dosage des composés phénoliques	22
1. 2.1. Dosage des polyphénols totaux	23
1. 2.2. Dosage des flavonoïdes.....	23
1. 2.3. Dosage des tanins condensés.....	25
2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	26
2.1. Effet du piégeage du radical libre (DPPH•)	26
2.2. Effet de piégeage du radical ABTS•+	28
2.3. Évaluation du potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP).....	30
Conclusion	32
Références bibliographiques	33

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre du tableau	Page
Tableau 1	Produits chimiques et L'appareillage.	15
Tableau 2	Rendements des différents extraits obtenus à partir de pelure de la grenade.	21
Tableau 3	Contenu en polyphénols totaux obtenus par les différents méthodes d'extraction.	22
Tableau 4	Contenu en flavonoïdes obtenus par les différentes méthodes d'extraction.	24
Tableau 5	Contenu des tanins condensés obtenu par les différentes méthodes d'extraction.	25

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	Les différentes parties du grenadier (<i>Punica granatum</i> L). A) arbre ; B) Fleur ; C) Pelure ; D) Fruit ; E) Graines.	04
Figure 2	Structures chimiques des différentes classes de polyphénols.	08
Figure 3	Formules structurales générales des acides phénoliques.	08
Figure 4	Structures chimiques des sous-classes de flavonoïdes	09
Figure 5	Schéma du principe de l'extraction par Soxhlet.	13
Figure 6	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	22
Figure 7	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.	24
Figure 8	Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.	25
Figure 9	Courbe d'étalonnage de Trolox pour le test au DPPH.	26
Figure10	Activité neutralisant le radical DPPH• par les différents extraits de la pelure de grenade.	27
Figure11	Courbe d'étalonnage de Trolox pour le test à l'ABTS.	28
Figure12	Activité neutralisant le radical ABTS ^{•+} par les différents extraits de la pelure de grenade.	29
Figure13	Courbe d'étalonnage au FeSO ₄ pour le test du FRAP.	30
Figure14	Potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP) des différents extraits de la pelure de grenade.	31

Liste des abréviations

ABTS: 2, 2-azinobis-éthylbenzothiazoline6-sulphonate.

COX-1: Cyclooxygenase-1.

COX-2: Cyclooxygenase-2.

DPPH: 2, 2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazyl.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

HPG : Huile de Pépins de Grenade.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases.

PI : Pourcentage d'Inhibition

TPC : Contenu total en polyphénols.

Introduction

Dans l'Union européenne, près de 40% du gaspillage alimentaire total provient des déchets alimentaires engendrés lors de la transformation des aliments (Roukas *et al.*, 2020). Il est important de noter qu'une grande partie de ce gaspillage alimentaire est constituée de sous-produits qui contiennent des composés valorisables. Par exemple, la grenade (*Punica granatum L.*), un fruit largement cultivé dans le monde entier, présente des opportunités intéressantes pour valoriser ces composés (Kandylis *et al.*, 2020).

Selon les recherches menées par Turrini *et al.* En 2019 et Nazeam *et al.* En 2020, le fruit de la grenade se compose des proportions suivantes : 50% de peau, 40% d'arilles et 10% de graines. Ainsi, environ 60% du fruit est généré sous forme de sous-produits lors du processus de transformation, ce qui pourrait éventuellement conduire à leur mise au rebut, (Gullón *et al.*, 2020).

Cependant, ces sous-produits renferment d'importantes quantités de composés phénoliques tels que des flavonoïdes et des tanins, ainsi que des sucres, des acides organiques et des minéraux. De plus, ces sous-produits présentent des propriétés bénéfiques telles que des activités antioxydantes, antifongiques et antibactériennes, (Kandylis *et al.*, 2020 ; Gullón *et al.*, 2020 et Singh *et al.*, 2019). En résumé, les études révèlent que la grenade présente un potentiel intéressant pour la valorisation de ses sous-produits riches en composés bénéfiques, en particulier sa peau, qui peut être une source précieuse d'extraits bioactifs. Les composés phénoliques présents dans les végétaux offrent de nombreux bienfaits pour la santé humaine. Bien qu'il existe plusieurs méthodes de récupération de ces composés (d'Ameer *et al.*, 2017).

Cette étude a permis de réaliser une étude phytochimique approfondie de la pelure de grenades en utilisant différentes méthodes d'extraction : l'infusion, la macération et le Soxhlet.

Ce mémoire est organisé en trois parties distinctes. La première partie aborde la théorie et présente des informations générales sur la grenade. Dans la deuxième partie, le focus est mis sur le matériel et les méthodes utilisées, y compris les divers métaux expérimentaux examinés. Enfin, la troisième partie synthétise les résultats obtenus et propose une discussion approfondie sur les conclusions de cette étude.

PARTIE



THEORIQUE

Généralités sur la grenade

I. Généralités sur le grenadier

I.1. Historique

La grenade, fruit du grenadier (*Punica granatum* L.) est l'un des premiers fruits cultivés par l'homme (4000-3000 avant notre ère) (Ge *et al.*, 2021). C'est un fruit originaire d'Iran et des pays voisins où il s'est progressivement développé dans l'Himalaya, le Moyen-Orient et la région de l'Asie centrale à la Méditerranée. Il est également bien cultivé en Arizona et en Californie et en Asie du Sud (Shahrbabaki, 1997). La grenade est mentionnée dans la Bible, le Coran et l'Art bouddhiste et chinois. Elle est considérée comme un fruit béni dans la culture chinoise, et il est évocateur fertilité et de postérité. Dans le Coran, la grenade est citée comme fruit du paradis (Langley, 2000 ; Newman *et al.*, 2007).

Le Grenadier a été décrit pour la première fois par Théophraste, un botaniste de la Grèce antique (2350 ans avant le présent). C'est un arbre qui fait partie de cinq premières cultures d'arbres fruitiers domestiquées à savoir, le figuier, le dattier, la vigne, et l'olivier. Il a toujours été symbole de santé comme l'ont dit de nombreuses cultures anciennes (Adsule et patil, 2005 ; Levin, 2006b).

I.2. Le grenadier (*Punica granatum*)

Punica granatum L. est un arbre fruitier appartenant à la famille des Punicaceae, distribué dans le monde entier. Cet arbre produit des grenades de différentes variétés. Diverses parties de la grenade, y compris les graines, la pelure, le jus et les feuilles, sont riches en composés bioactifs potentiels (Eghbali, *et al.*, 2021). Les grenades sont principalement confinées aux régions tropicales et subtropicales et poussent bien dans les climats arides et semi-arides (Erkan *et al.*, 2011).

Depuis son apparition dans ses pays d'origine à nos jours, la grenade s'est propagée aux pays des quatre coins du monde. Les missionnaires espagnols ont apporté des grenades en Amérique au XVI^e siècle (Hodgson, 1917 ; Larue, 1980). Actuellement, les principales régions de culture commerciale de la grenade dans le monde sont le Moyen-Orient, l'Inde et pays voisins, et l'Europe du Sud. Aux Etats-Unis, c'est principalement concentré dans la vallée de San Joaquin en Californie du Sud (La Rue, 1980).

I.3. Description botanique et répartition géographique

Le grenadier est un arbuste de 3 à 8 mètres de haut, persistant sous les tropiques et caduc dans les régions subtropicales et tempérées (Singh *et al.*, 2006). Les grenadiers sont

généralement épineux, à feuilles caduques, avec des tiges courtes et de petites feuilles allongées (Figure 1), (Erkan *et al.*, 2011).

Les fleurs sont écarlates, blanches ou panachées. Elles font plus de 2 cm de diamètre avec 5 à 8 pétales plissés et calice tubulaire charnu rouge restant sur le dessus des fruits. Les fleurs peuvent être simples ou groupées en 2 à 3 au bout de la branche (Kumari, 2012).

Les fruits de la grenade mesurent de 6,25 à 12,5 cm de large et pèsent de 200 à 650 grammes (Holland *et al.*, 2009). Ils sont blancs/verts, roses ou rouges avec un fond extérieur jaune. La couleur de la pulpe suit la couleur extérieure. Il existe également une race rare avec une couleur extérieure noire. L'arille, partie comestible du fruit, contient une couche charnue qui se développe complètement à partir des cellules épidermiques externes de la graine rayonnante. La taille et la dureté des graines varient selon le cultivar. Les variétés dites sans pépins contiennent des graines molles (Holland *et al.*, 2009).

La grenade possède une peau lisse et coriace divisée par une fine membrane non comestible en une série de cellules, chacune remplie de pépins contenues dans des sacs de pulpe juteuse (Holland *et al.*, 2009). L'épaisseur de la peau dépend de la variété cultivée dans différentes parties du monde. Le génotype sauvage a une fermeté et une dureté et une ténacité élevée des graines (Al-Said *et al.*, 2009).

I.4. Nomenclature et classification botanique

Le nom grenade vient du mot latin "pomum" signifiant pomme et "granatus" signifiant plein de graines. Le nom botanique vient du vieux français, grenade-pomme grenade. La classification botanique selon Kumari et al. (2012) est décrite comme suit :

Nom botanique : *Punica granatum*.

Règne : Plantae (Angiosperme).

Ordre : Myrtales.

Famille : Lythraceae.

Genre : *Punica*.

Espèce : *P. granatum*.



Figure 1 : Différentes parties du grenadier (*Punica granatum* L.). **A)** Arbre ; **B)** Fleur ; **C)** Pelure ; **D)** Fruit ; **E)** Graines (Ge *et al.*, 2021).

I.5. Utilisation de la grenade en médecine traditionnelle

La grenade a été souvent utilisée en médecine traditionnelle dans différentes cultures, avec des preuves documentées remontant à plus de 1550 avant le présent dans le papyrus égyptien Ebers (Braga *et al.*, 2005).

La grenade est un fruit riche en tanins, ce qui lui confère une grande capacité astringente. Différentes parties de la plante, comme les fleurs et la pelure, ont été utilisées en médecine traditionnelle, pour traiter diverses affections. Les infusions ou décoctions à base de fleurs étaient employées pour traiter la diarrhée et les infections vaginales. Les gargarismes à base d'extrait de la pelure de grenade étaient utilisés pour soulager l'inflammation pancréatique. Le jus rafraîchissant du fruit était recommandé pour favoriser la guérison des affections de la vésicule biliaire. De plus, les graines de grenade, contenant une faible concentration en tanins, étaient couramment utilisées dans le traitement et la cicatrisation des plaies. Les extraits éthanoliques de l'écorce de racine du grenadier, riches en alcaloïdes,

étaient utilisés pour leurs propriétés vermifuges, aidant à éliminer les parasites intestinaux (Viswanath *et al.*, 2019).

La grenade est un fruit aux propriétés thérapeutiques scientifiquement prouvées, telles que ses effets antiathérogènes, antiparasitaires, antibactériens, antioxydants, anticancérigènes et anti-inflammatoires (Adhami *et al.*, 2009 ; Akpinar *et al.*, 2012). Elle possède un large éventail d'effets antibactériens, agissant contre les bactéries à Gram-négatives et à Gram-positives, les champignons et les moisissures. Plusieurs études ont montré que l'extrait de pelure de grenade présente une activité importante contre les pathogènes bactériens et fongiques, grâce à sa teneur élevée en flavonoïdes et en tanins (Dahham, *et al.*, 2010 ; Casquete *et al.*, 2015 ; Ismail *et al.*, 2016). En outre, l'extrait de grenade pourrait offrir une nouvelle approche pour réduire l'inflammation et la douleur associées à des affections cutanées, notamment dans le traitement de l'infection au virus de l'herpès (Herpes Simplex Virus, HSV) telle que la kératite interstitielle herpétique (Vidal, *et al.*, 2003 ; Patel *et al.*, 2008).

Les antioxydants naturels présents dans les fruits de la grenade sont bénéfiques pour protéger contre le stress oxydatif, réduire le risque de maladies chroniques et prévenir leur progression (Lansky et Newman, 2007 ; Viuda-Martos *et al.*, 2010 ; Zaouay, 2012)

I.6. Composition chimique des différents organes du grenadier

La grenade (*Punica granatum*) est un fruit riche en tanins, en flavonoïdes, et en alcaloïdes, contribuant à ses propriétés astringentes, antioxydantes, anti-inflammatoires et vermifuges (Braga *et al.*, 2005). Les différentes parties du fruit de la grenade contiennent des quantités variables de composés tels que des vitamines (vitamine C et vitamine K), des polysaccharides, des minéraux (tels que le potassium), des polyphénols (notamment les anthocyanes et les flavonoïdes) et des glucides, qui sont les 16 ingrédients les plus abondants dans la grenade (Lansky et Newman, 2007).

L'huile de pépins de grenade (HPG) constitue environ 12 à 20 % du poids total des graines. Elle est principalement composée d'environ 80 % d'acide octadéca-diénoïque conjugué, également connu sous le nom d'acide punicoïque. Celui-ci est synthétisé *in situ* à partir de l'acide octadécadiénoïque non conjugué, l'acide linoléique (Hornung *et al.*, 2002), qui représente environ 7 % de l'HPG. Les acides gras représentent plus de 95 % de l'huile, principalement sous forme de triacylglycérol. Les constituants mineurs incluent les stérols, les stéroïdes et les cérébrosides, importants pour la gaine de myéline mammaire (Tsuyuki *et al.*, 1981).

Les feuilles du grenadier contiennent de l'apigénine glycoside, une flavone ayant des propriétés progestatives et anxiolytiques (Paladini *et al.*, 1999 ; Zand *et al.*, 2000). Elles sont également riches en minéraux tels que l'azote (N), le potassium (K), le fer (Fe) et le calcium (Ca), dont les concentrations varient selon l'âge du grenadier (Munde *et al.*, 1980,).

Les fleurs contiennent des composés qui se trouvent également dans la pelure (acide gallique) et dans les graines (acide ursolique) et très probablement des composés uniques et caractéristiques (colchicine, morphine et quercétine), (Huang *et al.*, 2005c).

La pelure de grenade est quant à elle est riche en de nombreux composés phytochimiques, qui sont principalement des acides phénoliques, des flavonoïdes et des tanins (Amri,*et al.*, 2017 ; Singh, *et al.*, 2018). Les principaux acides phénoliques identifiés à partir de l'EPG sont l'acide ellagique, l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide p-coumarique et l'acide cinnamique (Elfalleh, *et al.*, 2011 ; Stojanovic *et al.*, 2017).

Les composés phénoliques

II. Les composés phénoliques

II.1. Définition

Les polyphénols sont des composés naturels bioactifs principalement synthétisés par les plantes. Ces composés sont largement retrouvés dans les aliments, notamment dans les fruits et légumes, les graines, les fleurs et les écorces d'arbres (Bertelli *et al.*, 2021). Ils sont en partie responsables des qualités sensorielles et nutritionnelles des aliments végétaux, dont l'astringence, la couleur et l'odeur variant selon la teneur en ces composés (Pandey et Rizvi, 2009). Au cours des dernières décennies, les polyphénols font l'objet d'un nombre croissant de recherches démontrant que la consommation de polyphénols peut jouer un rôle vital dans la santé grâce à la régulation du métabolisme, du poids, des maladies chroniques et de la prolifération cellulaire. Leurs bienfaits dépendent de la quantité consommée et de leur biodisponibilité. (Manach *et al.*, 2004 ; Cory *et al.*, 2018).

II.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et des éléments structuraux qui relient ces anneaux les uns aux autres (Pandey et Rizvi, 2009). Cinq grandes classes de polyphénols sont identifiées ; les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes (Grosso *et al.*, 2014 ; Ofose *et al.*, 2020).

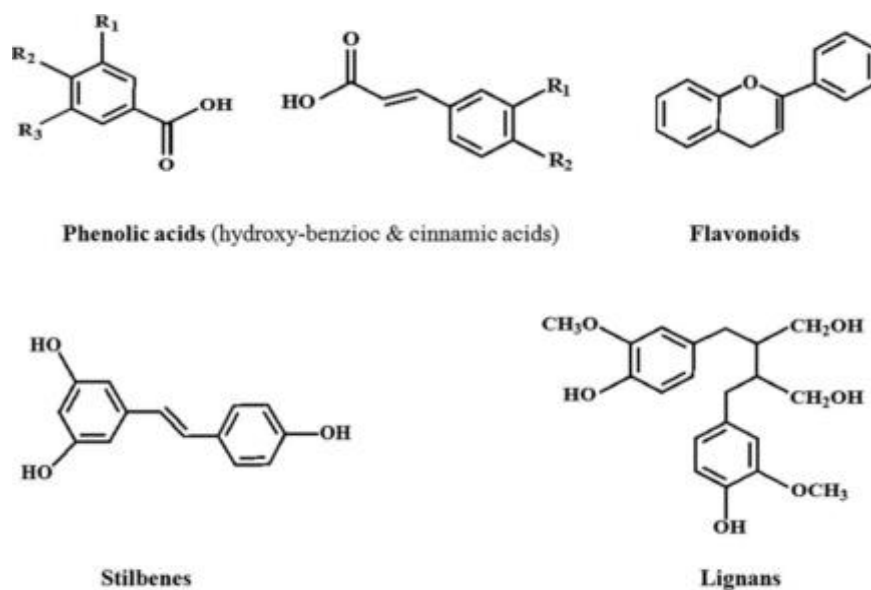


Figure 2 : Structures chimiques des différentes classes des polyphénols (Ribereau-Gayon, 1968)

II.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés chimiques naturels présents dans de nombreux végétaux, caractérisés par la présence d'un groupe phénol (Yao, 2004). Les acides phénoliques peuvent être distingués en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (Pandey et Rizvi, 2009). La teneur en acide hydroxybenzoïque des plantes comestibles est généralement très faible, à l'exception de certains fruits rouges, radis noirs et oignons (Naczka, 1995). *Au contraire*, les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques et se composent principalement d'acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Pandey et Rizvi, 2009).

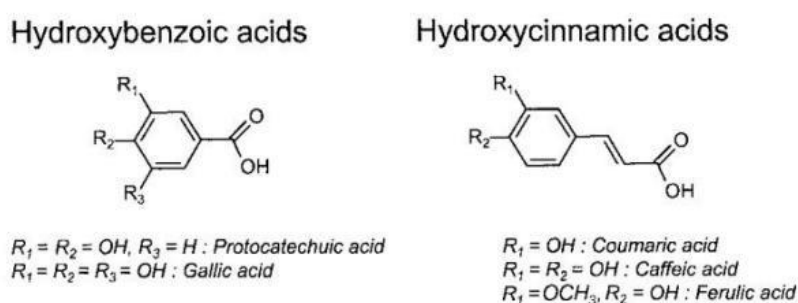


Figure 3 : Formules structurales générales des acides phénoliques (Manach *et al.*, 2004).

II.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des polyphénols largement retrouvés dans les aliments d'origine végétales, et aussi les plus étudiés. Ils sont responsables des pigments de couleur des fruits, des légumes, des épices et des plantes médicinales (Bravo, 1998 ; Kanwal, *et al.*, 2011). Selon leur degré d'hydroxylation et la présence d'une double liaison en C2-C3 dans le cycle pyrone hétérocyclique, les flavonoïdes sont répartis en 13 classes. Les plus importants sont les flavonols, les flavanols, les flavones et les isoflavones, les anthocyanidines ou anthocyanes et les flavanones (Scalbert et Williamson, 2000 ; Sanchez-Moreno, 2002).

Les flavonoïdes ont la capacité de se lier aux monosaccharides et aux disaccharides, ainsi que de former des complexes avec des oligosaccharides, des lipides, et des amines. Ces composés existent également sous forme de dérivés sulfatés ou méthylés et peuvent également s'associer avec des acides organiques (Yao, 2004).

Parmi les flavonoïdes, les plus connus, la quercétine, la catéchine, la naringénine, le cyanidine-glycoside et la daidzéine. Ces composés sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et bienfaits pour la santé (M.D, 2007)

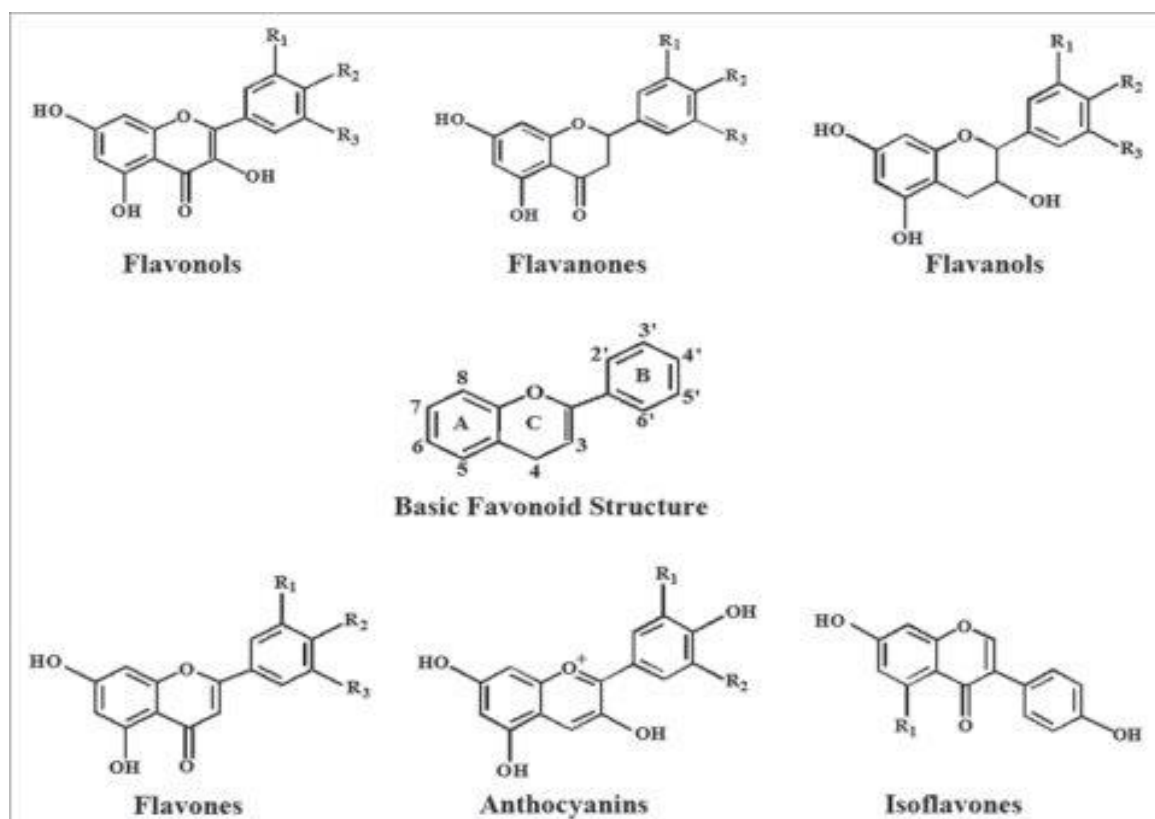


Figure 4 : Structures chimiques des sous-classes de flavonoïdes (Pandey et Rizvi, 2009).

II.2.3. Tanins

Les tanins forment un groupe hétérogène de composés phénoliques hydrosolubles de poids moléculaire élevé (Rathod *et al.*, 2023). Ils sont classés en tanins hydrolysables et condensés. Les tanins hydrolysables sont classés en gallotanins et ellagitanins, retrouvés dans de nombreux végétaux. Ils sont caractérisés par la présence de groupes gallole dont l'hydrolyse donne des sucres et de l'acide gallique qui sont responsables de leurs propriétés chimiques et biologiques spécifiques (Pereira *et al.*, 2009 ; Lamy *et al.*, 2016).

II.3. Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols ont été largement étudiés pour leurs nombreuses bio-activités bénéfiques pour la santé de l'homme. Il s'agit particulièrement de propriétés antioxydantes, cardioprotectrices, anticancéreuses, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (Arts et Hollman, 2005 ; Li *et al.*, 2014).

II.3.1. Activité antioxydante

De nombreuses expériences *in vitro* ont montré que les composés phénoliques tels que l'acide rosmarinique et l'acide férulique, contribuent de manière significative à la capacité antioxydante des plantes (Roy *et al.*, 2010). Les polyphénols agissent également comme antioxydants *in vivo* par la capture des radicaux libres, l'inhibition de la peroxydation des lipides, l'activation des enzymes anti-oxydante (Li *et al.*, 2014). Les polyphénols peuvent non seulement être utilisés comme antioxydants chez l'homme, mais aussi comme conservateurs en industrie alimentaire (Li *et al.*, 2014).

II.3.2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est reconnue comme un facteur essentiel dans de nombreuses maladies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et l'obésité. Les polyphénols ont démontré des effets anti-inflammatoires significatifs *in vivo* et *in vitro* (Santangelo *et al.*, 2007). Il existe de multiples mécanismes anti-inflammatoires des polyphénols *in vivo*, dont l'inhibition des enzymes génératrices d'eicosanoïdes telles que la phospholipase A2 (PLA2) et les cyclooxygénases (COX) (Kim *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2014).

La quercétine est un flavonoïde qui peut jouer un rôle important dans la réduction du risque d'athérosclérose où l'inflammation est un élément clé dans le processus de formation et de progression des plaques d'athéromes (Kostyuk *et al.*, 2011). De plus, les polyphénols sont

capables d'inhiber la libération du monoxyde d'azote (NO) en agissant sur l'expression de l'enzyme catalysant sa formation, la NO-synthase (NOS) (Stangl *et al.*, 2007). Ils régulent également les cytokines qui sont des médiateurs essentiels de la communication locale et intercellulaire impliqués dans les processus immunitaires et inflammatoires (Miles *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il a été démontré que les polyphénols sont impliqués dans la modulation de la voie de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinases) en agissant à différentes étapes de la cascade d'activation. Par modulation du processus de phosphorylation et de déphosphorylation de protéines effectrices, conduisant ainsi à des effets antioxydants, anti-inflammatoires et anti-cancéreux, pouvant contribuer à la prévention de certaines maladies chroniques et à la promotion d'une meilleure santé globale (Soobrattee *et al.*, 2005 ; Pandey et Rizvi, 2009 ; Prasad et Aggarwal, 2011).

II.3.3. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des polyphénols est un sujet d'intérêt croissant dans le domaine de la recherche médicale, les polyphénols étant reconnus pour leur capacité à inhiber la croissance de certaines bactéries pathogènes. Les polyphénols possèdent également des activités antifongique et antivirale potentielles (Cushnie et Lamb 2005 ; Jung *et al.*, 2005 ; Baydar *et al.*, 2006). En effet, il a été démontré que les polyphénols entravent l'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules de l'hôte, inhibent la formation de biofilms protecteurs, neutralisent les toxines bactériennes nocives et agissent en synergie avec les antibiotiques, renforçant ainsi leur efficacité (Chen *et al.*, 2018 ; Zhou *et al.*, 2019 ; Bessa *et al.*, 2020).

La capacité des polyphénols à cibler différents facteurs de virulence microbienne offre un potentiel prometteur dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques et améliorer la prise en charge des maladies infectieuses (Pranav *et al.*, 2022).

Méthodes d'extraction conventionnelles

III. Méthodes d'extraction conventionnelles

L'extraction constitue une étape essentielle dans l'analyse phytochimique, du fait de la nécessité d'extraire les composés cibles afin de les isoler et de les caractériser (Fabricant et Farnsworth, 2001). Les techniques d'extraction traditionnelles sont connues depuis longtemps comme des techniques d'extraction classiques ou conventionnelles. Elles sont encore utilisées aujourd'hui et sont basées sur l'utilisation de solvants, de l'agitation et du chauffage. Les plus utilisées sont l'infusion, la macération, et Soxhlet (Tambun, *et al.*, 2020).

III.1. Infusion

L'infusion est une méthode d'extraction largement utilisée pour préparer des boissons à base de plantes médicinales. Elle consiste à verser de l'eau bouillante sur une quantité déterminée de matière végétale sèche ou fraîche. Ce mélange est laissé reposer pendant un certain temps. Pendant ce processus, les composés solubles dans l'eau se dissolvent et se mélangent au liquide, créant ainsi une boisson aromatique et bénéfique pour la santé (Cheng *et al.*, 2015).

III.2. Macération

La macération est une méthode traditionnelle largement utilisée qui implique de mettre le matériau végétal en contact avec un solvant, avec ou sans agitation, à température ambiante ou à une température élevée pendant une période spécifique (Ecribano *et al.*, 2003). Le processus de macération implique généralement plusieurs étapes, dont la première étant le broyage de la matière végétale en petites particules afin d'augmenter la surface de contact avec le solvant d'extraction. Un solvant approprié est ensuite ajouté à la matière végétale pour entamer le processus de macération dans un récipient fermé hermétiquement. Une fois la durée de macération terminée, le macérât est filtré pour séparer les particules solides. L'agitation est un paramètre qui permet d'améliorer la qualité de la macération par augmentation de la diffusion des particules dans le solvant. De plus, la solution concentrée à la surface des particules de l'échantillon est éliminée pour introduire un nouveau solvant et augmenter l'efficacité de l'extraction (Azmir *et al.*, 2013).

III. 3. Soxhlet

L'extraction Soxhlet est une méthode proposée et développée pour la première fois en 1879 par Franz von Soxhlet, un agrochimiste allemand. C'est une technique couramment

utilisée, où le matériau végétal est placé dans un support en papier filtre ou en cellulose appelé "cartouche". Ce support est ensuite inséré dans un porte-dosette qui est rempli de solvant d'extraction. Le solvant est chauffé dans un ballon inférieur. A ébullition, les vapeurs du solvant chauffé passent dans le sac d'échantillon puis se condense sous l'effet du système de refroidissement et retourne dans le support pour effectuer l'extraction (Figure 5).

Un siphon se crée lorsque le niveau de liquide atteint le niveau de débordement. Le dispositif est utilisé pour transférer le liquide contenu dans la cartouche vers le ballon de distillation. Ce processus permet d'entraîner les substances extraites dans le liquide. L'opération se poursuit jusqu'à ce qu'une extraction complète soit obtenue (Handa *et al.*, 2008).

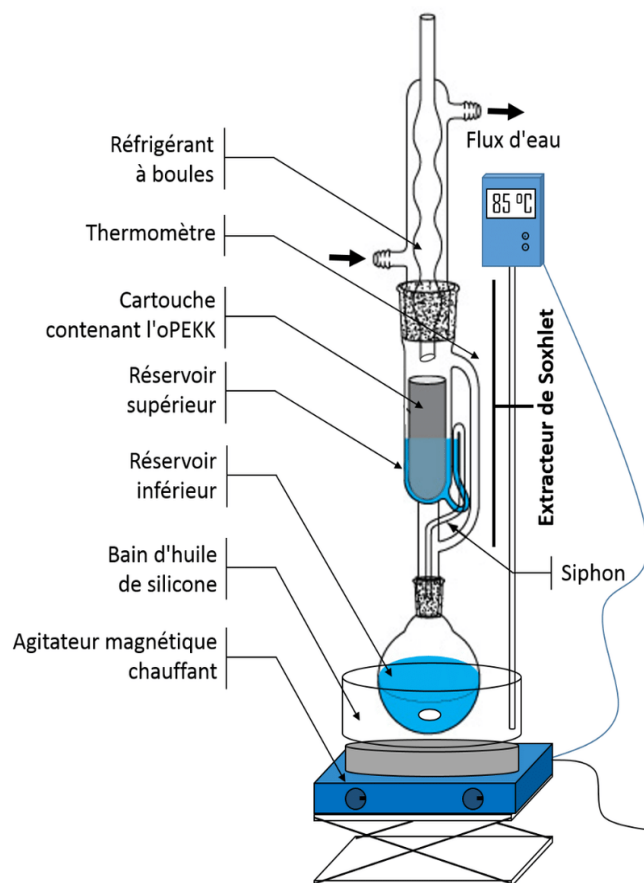


Figure 5 : Schéma du principe de l'extraction par Soxhlet (Alexandre, 2017)

III.4. Autres méthodes conventionnelles

III.4.1. Digestion

La méthode de digestion est généralement utilisée pour obtenir des extraits de plantes aromatiques. Le processus de digestion est une macération à chaud, mais avec l'avantage d'utiliser une chaleur douce pendant l'étape d'extraction, ce qui améliore l'efficacité de l'extraction par solvant (Manousi *et al.*, 2019). Grâce à la digestion, le rendement d'extraction est souvent augmentée et des extraits de meilleure qualité peuvent être obtenus (Azmir *et al.*, 2013).

III.4.2. Décoction

Cette méthode est principalement utilisée pour extraire les composés actifs des parties souterraines des plantes, telles que les racines, ainsi que des écorces. Ces parties ont tendance à libérer leurs principes actifs de manière plus efficace lorsqu'elles sont soumises à une décoction qu'à une infusion (Nogaret-Ehrhart, 2003). Généralement, le rapport initial entre l'échantillon de substances médicamenteuse et l'eau est d'un quart (1:4) ou d'un seizième (1 :16). L'ébullition réduit le mélange au quart de son volume d'origine en raison de l'évaporation qui se produit pendant la décoction (Manousi *et al.*, 2019). Une fois l'extraction par décoction terminée, l'extrait concentré est filtré et est utilisé sur place ou pour un traitement ultérieur (Handa *et al.*, 2008).

PARTIE



EXPÉRIMENTALE

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

La pelure du fruit de la grenade, étudiée dans ce travail a été récoltée à partir de grenades du commerce dans la ville de Bejaïa durant la période d'octobre à novembre 2022. Après consommation des fruits, la pelure de grenade a été récupérée et séchée à l'abri de la lumière pendant plusieurs semaines. La pelure séchée a été ensuite broyée en poudre fine (<250µm), gardée dans des récipients en verre hermétiquement fermés jusqu'au moment de l'extraction.

I.2. Réactifs et appareils

Le Tableau ci-dessous présente les produits chimiques et appareils utilisés pour la réalisation de cette étude.

Tableau 1 : Produits chimiques et appareils utilisés.

Produits	Appareils
Ethanol.	Etuve (MEMMERT)
Standards (acide gallique, quercétine, catéchine, trolox).	Centrifugeuse.
Folin-Ciocalteu.	Spectrophotomètre (BIOTECH ENGINEERING MANAGMENT)
Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃).	Evaporateur rotatif (BÜCHI Heating Bath B-490)
Chlorure d'aluminium (AlCl ₃).	Bain marie (MEMMERT).
Vanilline.	pH-mètre.
Chlorure d'hydrogène (HCl).	Soxhlet (BEHR labor-technik).
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).	Broyeur électrique (ROBOSTE/ BRANDMANN, Germany styl 1°).
Acide 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonique (ABTS).TPTZ (2,4,6-Tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine).	Vortex (VELP SCIENTIFICA).
Acétate de sodium (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Tamiseur électrique (RETSCH).
Acide acétique (CH ₃ COOH).	Balance de précision (ADVENTURER OHAUS).
Trichlorure de fer hexahydraté (FeCl ₃ -6H ₂ O).	
Sulfate ferreux heptahydraté (FeSO ₄ -7H ₂ O).	

I.2. Méthodes

La partie expérimentale de ce travail a été réalisée dans le laboratoire BPC4 (laboratoire de cryptogamie) de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa.

I.2.1. Préparation des extraits

L'extraction de la poudre préparée à partir de la pelure de grenade a été effectuée par trois méthodes conventionnelles différentes ; l'infusion, la macération et Soxhlet. Chacune des extractions a été réalisée trois fois.

I.2.1.1. Extraction par infusion

Dix grammes (10 g) de la poudre de la pelure de grenade sont pesés et ajoutés à 100 ml d'eau distillée préalablement chauffée jusqu'à ébullition à 100°C. Le mélange est agité en continu sur une plaque agitatrice pendant 10 min (Haj Ali *et al.*, 2018). Le mélange a été réparti dans des tubes puis centrifugé à 3000 t/min pendant 5 min. Ensuite, le surnageant de chaque tube a été filtré dans du papier whatman n°3. Le filtrat obtenu est mis à sécher dans l'étuve à 50°C. L'extrait obtenu est conservé à l'abri de la lumière dans des récipients opaques hermétique jusqu'au moment de l'analyse.

I.2.1.2. Extraction par Macération

L'extrait par macération a été préparé par adaptation de la méthode décrite par Ranjha *et al.* (2020). 10 g de la poudre de pelure de grenade ont été macérée dans 100 ml d'éthanol (70%) dans un bain marie à 60°C, sous agitation pendant 6 h. Le macérât obtenu a été ensuite centrifugé à une vitesse de 3000 t/min pendant 5 min. Le surnageant a été ensuite filtré sur du papier whatman. Afin d'éliminer l'excès de solvant, le filtrat a été évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60°C. Puis, le résidu de l'évaporation a été placé dans une étuve à une température de 50°C pour sécher. Une fois l'extrait sec, il est conservé dans des récipients hermétiques, à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'analyse.

I.2.1.3. Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet a été effectuée selon la méthode décrite par Ali *et Kumar* (2014). De l'éthanol à 70% a été également utilisé dans cette méthode. Une quantité définie de la poudre de la pelure de grenade est mise dans une cartouche et le solvant dans le ballon

avec un ratio de 10% (m /v). L'extraction est menée pendant 6 heures à 60°C. Après 8 cycles d'extraction, la cartouche est retirée et le solvant chargé de l'extrait de la pelure de grenade est récupéré pour être filtré. Après filtration, le filtrat est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60°C et le résidu de l'évaporation est séché dans une étuve à 50°C. L'extrait obtenu est conservé dans des flacons hermétiques et gardé à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'étude.

I.2.2. Dosage des composés phénoliques

I.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des extraits a été déterminé par la méthode au Folin-Ciocalteu. Cette méthode implique la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupes phénoliques hydroxylés, entraînant la formation d'un produit bleu foncé dans une solution alcaline (Li *et al.*, 2007). Le réactif du Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3P_4W_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui subit une réduction lors de l'oxydation des phénols, produisant un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (Ribéreau-Gayon, 1968).

Un volume de 0.5 ml du réactif du Folin-Ciocalteu (1:10) est ajouté dans chaque tube contenant 0,1 ml d'extrait. Après 4 minutes, 0.4 ml d'une solution de carbonates de sodium (Na_2CO_3) à 7.5% est ajoutée dans chaque tube. Les tubes sont ensuite agités au vortex, puis incubés à l'obscurité pendant 1.5 heure à température ambiante. À la fin de cette incubation, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm. En parallèle, une courbe d'étalonnage a été construite en utilisant l'acide gallique sur une gamme de concentrations allant de 0 à 200 $\mu g/ml$. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de cette gamme d'étalonnage. Cela nous a permis d'exprimer le contenu en polyphénols de chaque extrait en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EqAG/g extrait).

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes a été quantifié en utilisant la méthode au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), qui est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium (Bahorun *et al.*, 1996). Dans cette méthode, un volume de 0.5 ml d'une solution d' $AlCl_3$ à 2% dans de l'eau distillée a été ajoutée à un volume égal de chacun des extraits préparés. Après agitation au vortex, les tubes sont incubés à température ambiante pendant 10 min. Ensuite,

l'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à une longueur d'onde de 430 nm. Afin d'estimer la teneur en flavonoïdes, une gamme étalon avec différentes concentrations (0-50 µg/ml) de quercétine, un standard flavonoïde, a été préparée. Le contenu en flavonoïdes est calculé à partir de la gamme d'étalonnage, et est exprimé en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EqQ/g d'extrait).

2.2.3. Dosages des tanins condensés

Les tanins condensés sont dosés selon la méthode de la vanilline (Sun *et al.*, 1998). Un volume de 0.5 mL de vanilline (4% dans l'éthanol) est ajouté à 0.2 mL de chaque extrait. Après mélange des échantillon, 0.5 mL de HCl est rajouté dans chaque tube. Les tubes sont agités au vortex puis incubés à l'obscurité pendant 20 min à température ambiante. À la fin de cette incubation, l'absorbance est lue au spectrophotomètre ($\lambda=500$ nm). La concentration des tanins condensés est déterminée en utilisant l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie par la catéchine (0-50 µg/ml). Le contenu en tanins est donc quantifié en mg équivalent de tanins par gramme d'extrait sec (mg EqC/g d'extrait).

I.2.3. Etude de l'activité antioxydant

I.2.3.1. Effet du piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•)

Le potentiel antioxydant de différents extraits (infusion/macération/Soxhlet) a été évalué en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH. Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle est un radical libre stable de couleur violette foncée. Lorsqu'il est exposé à un antioxydant, il accepte un électron de cet antioxydant, ce qui entraîne une décoloration de sa forme réduite en 2,2-diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Zahin *et al.*, 2010).

Pour ce test, une solution de DPPH• a été préparée dans d'éthanol (0.1 mM), puis 0.5 ml de chaque extrait à une de concentration (1mg/ml) ont été ajoutés à 1 ml de la solution de DPPH. Après une incubation de 30 minutes à l'obscurité, les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde de 517 nm (Mokhnache et al., 2019). Le trolox a été utilisé pour tracer une droite d'étalonnage (0-0.1 mM/ml). L'activité antioxydante inhibitrice de l'oxydation du DPPH a été exprimée en mmol. équivalents en trolox par gramme d'extrait sec (mmol TEq /g extrait). Le pourcentage de l'activité antioxydante a été également calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

Sachant que : A_0 est l'absorbance du blanc (sans l'extrait) et A_t est l'absorbance du test (extrait ou standard).

I.2.3.2. Effet de piégeage du radical cationique 2,2'-azino-bis (3 éthylbenzo thiazoline-6-sulphonique) (ABTS⁺)

Le test à l'ABTS est basé sur la neutralisation d'un radical cation engendré par l'oxydation du composé synthétique chromophore appelé acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), (ABTS⁺). La variation du spectre d'absorption est suivie de façon spectrophotométrique (Re *et al.*, 1999).

Au préalable, une solution stock est préparée par dissolution de l'ABTS dans de l'eau distillée à une concentration de 7 mM, puis du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) est ajouté à une concentration de 2.45 mM. Ce mélange est agité pendant toute une nuit (12-16 heures) à l'obscurité et à température ambiante. Cette solution stock est diluée au moment de son utilisation dans l'éthanol de manière à atteindre une absorbance de 0.70 ± 0.02 à $\lambda = 734$ nm. Le test à l'ABTS est réalisé selon la méthode de Re *et al.* (1999). Un aliquot de 20 μ L de chaque extrait est mélangé à 2 mL de la solution diluée d'ABTS, puis incubée à 30°C pendant six minutes. L'absorbance est mesurée à $\lambda = 734$ nm contre un blanc. Une courbe standard est préparée en utilisant des concentrations croissantes (0-2 mM) de trolox. Les valeurs de la capacité antioxydante sont calculées à partir de la droite standard, et les résultats sont exprimés en mmol équivalent Trolox par gramme d'extrait (mmol TroloxEq/g d'extrait). La capacité de piégeage du radical cationique ABTS⁺ est également quantifiée en pourcentage (%), calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

Sachant que : A_0 est l'absorbance du blanc (sans l'extrait) et

A_t est l'absorbance du test (extrait ou standard).

I.2.3.3. Potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP)

Le potentiel antioxydant réducteur du fer des différents extraits de la pelure de grenade est évalué par la méthode décrite par Benzie et Strain (1999). Le réactif de FRAP est préparée en mélangeant du tampon acétate (300 mM, pH 3.6), une solution de TPTZ (10 mM de 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-1,3,4-triazine) dans 40 mM de HCl, et 20 mM de la solution de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ avec une proportions de 10:1:1 (v/v/v). Cette méthode permet de mesurer la capacité des antioxydants à réduire le fer par le suivi de l'absorbance du réactif FRAP à $\lambda = 593$ nm.

A chaque échantillon à tester, 65 μ l des différents extraits (dilués au 1/100) sont ajoutés à 200 μ l d'eau distillée et 2 ml du réactif de FRAP fraîchement préparé. Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, l'absorbance de chaque échantillon est mesurée à $\lambda = 593$ nm. Les résultats sont comparés à une courbe standard tracée pour une gamme de concentrations croissantes (0-2 mM) d'une solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Les valeurs du pouvoir antioxydant réducteur sont exprimées en mmol équivalents de Fe^{2+} par gramme d'extrait (mmol Eq. Fe^{2+} /g d'extrait).

I.2.4. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont présentés en tant que valeur moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique est effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism. 5 par analyse de la variance (ANOVA), suivie du test de Tukey. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme étant statistiquement significative.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

La présente étude est réalisée sur des extraits de pelure de grenade obtenus par les différentes méthodes d'extraction, qui sont l'infusion, la macération et Soxhlet. Le rendement de l'extraction a été calculé pour chaque méthode d'extraction. Leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés a été également déterminé puis l'activité antioxydante a été analysée par différents tests (DPPH, ABTS et FRAP).

II.1. Rendement de l'extraction

Les rendements d'extraction obtenus par chaque méthode sont exprimés en pourcentage (masse d'extrait/100g de la poudre). Comme le montre le tableau 2, les valeurs des rendements obtenus n'ont montré aucune différence significative entre l'infusion, la macération et le Soxhlet.

Tableau 2 : Rendements obtenus par les différentes méthodes d'extraction.

Extrait	Rendements (%)
Infusion	40.65 ± 0.08 ^{NS}
Macération	34.78 ± 0.24 ^{NS}
Soxhlet	54.11 ± 0.22 ^{NS}

NS : différence non significative (P>0.05).

D'après ces résultats, il apparaît qu'il n'y a aucune différence significative entre les rendements d'extraction obtenus par les différentes méthodes d'extraction.

Le rendement d'extraction est défini comme le quotient entre la quantité de composés naturels extraits par le processus d'extraction effectué avec un solvant donné et la quantité initiale de ces composés présente dans le matériel végétal d'origine. Il dépend de plusieurs paramètres tels que, la méthode d'extraction (macération, décoction, infusion), le choix des solvants ainsi que les propriétés chimiques des molécules extraites et les conditions d'exploitation (chaud ou froid). L'ensemble de ces facteurs influencent à la fois le rendement et la composition chimique des extraits obtenus. Ils ont par conséquent un impact direct sur les activités biologiques médiées par les métabolites extraits (Michel *et al.*, 2012).

L'utilisation de mélanges eau/solvant organique peut faciliter l'extraction de produits chimiques qui sont solubles dans l'eau et/ou dans le solvant organique (Do *et al.*, 2014). Nous avons obtenu un rendement par macération de 34.78 ± 0.24 %. Ce rendement est considéré comme important par rapport au rendement trouvé par Meziani *et al.* (2019) qui est de 33.7%. Par ailleurs, des rendements plus faibles ont été obtenus par Sarbaswarup *et al.* (2019) en utilisant la méthode d'infusion, en comparaison à notre résultat.

II.2. Dosage des composés phénoliques

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques sont des phyto-micronutriments résultants du processus métabolique secondaire chez les plantes (Cory *et al.*, 2018).

L'estimation du contenu en polyphénols totaux a été obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 6).

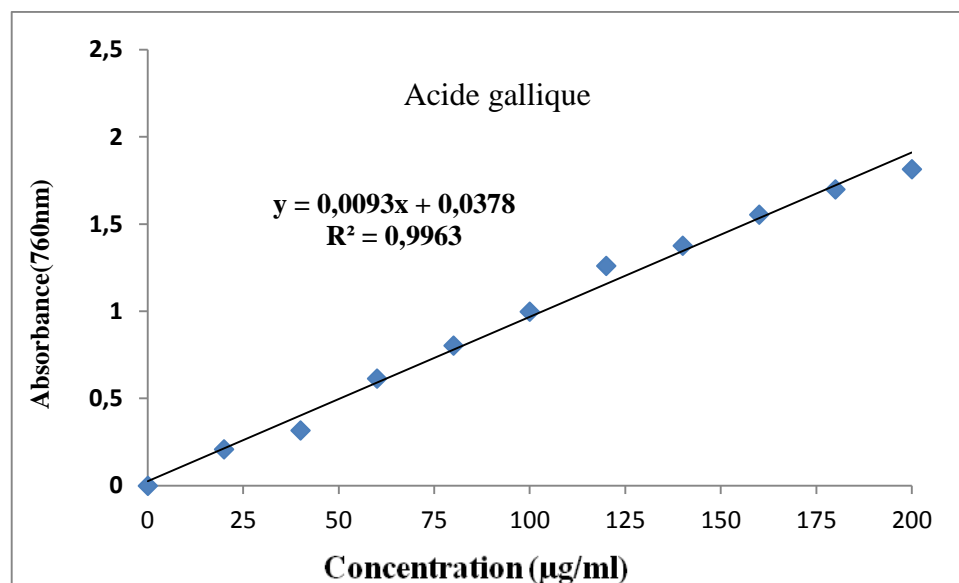


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Le tableau 3, présente les résultats du dosage des polyphénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu, dans les différents extraits préparés (infusion, macération et Soxhlet).

Tableau 3. Contenu en polyphénols totaux obtenu par différentes méthodes d'extraction de la pelure de grenade.

Méthodes d'extraction	Contenu en polyphénols (mg EAG/g d'extrait sec)
Infusion	289.123 ± 17.50 ^b
Macération	353.01 ± 06.69 ^a
Soxhlet	263.316 ± 09.68 ^b

Une lettre différente indique une différence significative ($P < 0.01$) entre les valeurs dans la même colonne.

Ces résultats révèlent que la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait obtenu par macération (353.01 ± 6.69 mg EAG/g d'extrait sec) est significativement plus élevée ($P < 0.01$) que celle obtenue par infusion (289.123 ± 17.50 mg EAG/g d'extrait sec) et par Soxhlet (263.316 ± 9.68 mg EAG/g d'extrait sec). La différence entre ces résultats pourrait être due au choix de la méthode d'extraction qui peut avoir un effet important sur la séparation des composés bioactifs ciblés à partir de la matière végétale. Par conséquent, un TPC élevé serait lié à un temps de contact plus long entre la poudre et le solvant dans macération par rapport à l'infusion. Ce temps aiderait à libérer plus de composés phytochimiques solubles (Sarbaswarup *et al.*, 2019).

De plus, l'effet de la température a été rapporté pour avoir aussi un effet sur l'extraction des polyphénols totaux. La chaleur contribue à faciliter l'extraction en augmentant la perméabilité des membranes cellulaires. Cependant, des températures excessivement élevées peuvent provoquer une dénaturation des composés à extraire (cas du soxhlet) (Wang *et al.*, 2011). Par ailleurs, les résultats obtenus peuvent être influencés par les conditions expérimentales des dosages. Le réactif du Folin-Ciocalteu, peut interagir avec diverses substances telles que les protéines, les sucres, l'acide ascorbique et des composés soufrés, ce qui pourrait interférer dans les dosages obtenus (Li *et al.*, 2006 ; Jinnawat *et al.*, 2012).

Des études antérieures ont montré des valeurs différentes en polyphénols totaux dans l'extrait obtenu par macération et par infusion en comparaison à notre résultat (Zahin *et al.*, 2010 ; Meziani *et al.*, 2019 ; Sarbaswarup *et al.*, 2019).

Le profil phénolique des extraits de plantes peut varier selon notamment la variété utilisée, le climat, la situation géographique (Ryan *et al.*, 1999). La température et le solvant d'extraction sont également de facteurs de variabilité (Sousa *et al.*, 2006 ; Conde *et al.*, 2009).

III.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium où, la quercétine a été utilisée comme étalon. Les résultats obtenus à partir de la courbe d'étalonnage sont présentés dans figure 7.

La quantité des flavonoïdes a été exprimée en milligrammes équivalents de quercétine par gramme de poids sec de l'échantillon (mg EQ/g d'extrait sec).

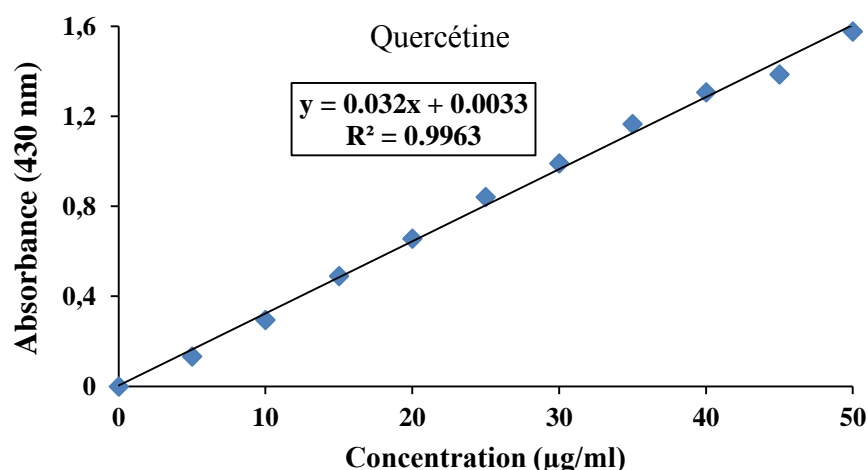


Figure 7 : Courbe d'étalonnage à la quercétine pour le dosage de flavonoïdes.

A partir de courbe d'étalonnage, les teneurs des flavonoïdes obtenus par les différentes méthodes d'extractions (infusion, macération, Soxhlet) sont présentées dans le **tableau 4**.

Tableau 4. Contenu en flavonoïdes obtenus de la pelure de grenade par les différentes méthodes d'extractions.

Méthodes d'extraction	Contenu en flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait sec)
Infusion	21.13 ± 1.18 ^a
Macération	21.08 ± 1.79 ^a
Soxhlet	12.54 ± 0.09 ^b

Une lettre différente indique une différence significative ($P < 0.01$) entre les valeurs dans la même colonne.

Ces résultats révèlent que la teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait obtenu par infusion (21.13 ± 1.18 mg EQ/g d'extrait sec) est similaire à celle obtenue par macération (21.08 ± 1.79 d'extrait sec). Tandis que la teneur obtenue par Soxhlet (12.54 ± 0.09 mg EQ/g d'extrait sec) est significativement ($P < 0.01$) plus faible.

Cette variation des résultats peut être attribuée aux variations entre les méthodes d'extraction, pouvant influencer les propriétés intrinsèques des substances extraites. La différence pourrait également être due à la méthode spectrométrique du dosage des flavonoïdes totaux où une absence possible de réactivité de certains flavonoïdes avec le trichlorure d'aluminium, ce phénomène pouvant entraîner une légère sous-estimation du

contenu réel de l'extrait (Meziani *et al.*, 2019). D'autres études ont montré des teneurs plus élevées en flavonoïdes dans l'extrait obtenu par macération et des valeurs plus faibles dans l'extraction par infusion (Meziani *et al.*, 2019 ; Sarbaswarup *et al.*, 2019).

III.2.3. Dosage des tanins condensés

Le contenu en tanins condensés a été estimé par rapport à la gamme étalon tracée pour des concentrations croissantes en catéchines (Figure 8).

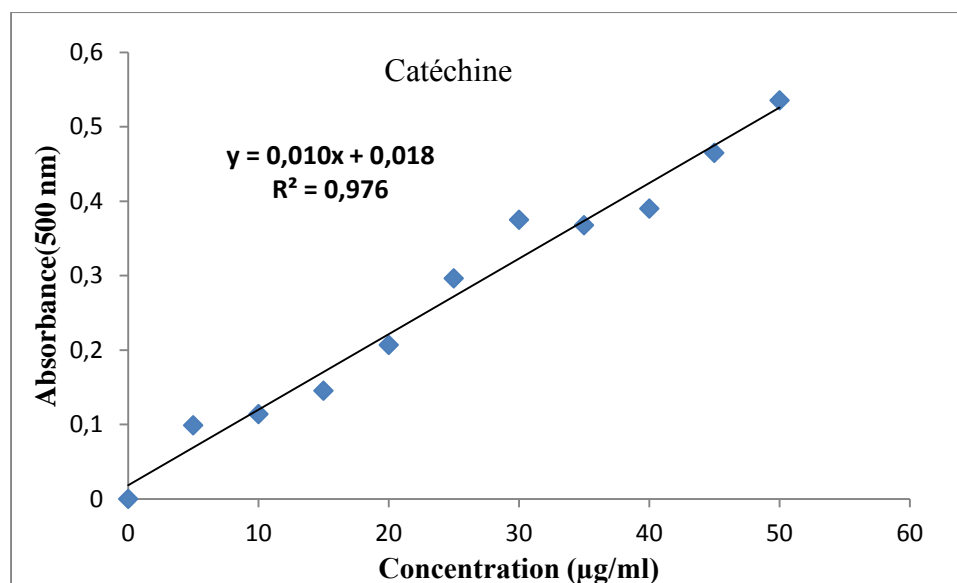


Figure 8 : Courbe d'étalonnage à la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

La quantité des tanins condensés a été exprimée en milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extrait sec (mg EC/g d'extrait sec). A partir de la courbe étalonnage, la teneur des tanins condensés obtenus par les trois méthodes d'extraction sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Contenu en tanins condensés obtenu de la pelure de grenade par les différentes méthodes d'extractions.

Méthodes d'extraction	Contenu en tanins condensés
	(mg EC/g d'extrait sec)
Infusion	2.80 ± 0.02
Macération	2.81 ± 0.02
Soxhlet	2.81 ± 0.006

Ces résultats révèlent que des teneurs similaires en tanins condensés sont contenues dans les extraits obtenus par infusion, par macération et par Soxhlet. Des valeurs équivalentes ont été retrouvées par l'étude de Meziani et al. (2019).

III.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante sont utilisées pour mesurer la capacité d'une substance à neutraliser les radicaux libres et à prévenir les dommages oxydatifs dans le corps. Les différents extraits de la pelure de grenade ont été soumis à une évaluation de leur activité antioxydant à l'aide des méthodes DPPH, ABTS et FRAP.

III.3.1. Effet du piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•)

Le test DPPH est une méthode très utilisée pour analyser l'activité anti-oxydante. Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm et de cette manière le potentiel antioxydant d'une substance ou d'un extrait de plante peut être déterminé (Popovici *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus par le test du DPPH ont montré que les trois extraits analysés sont capables d'exercer un puissant effet neutralisant du radical libre DPPH•. A une concentration de 0.5 mg/ml, l'extrait de l'infusion a montré un pourcentage d'inhibition de l'oxydation du DPPH (PI) de $84.07 \pm 0.15\%$. Des valeurs équivalentes ont été obtenues par macération ($84.47 \pm 0.13\%$) et par Soxhlet ($84.80 \pm 0.10\%$) (Figure 9).

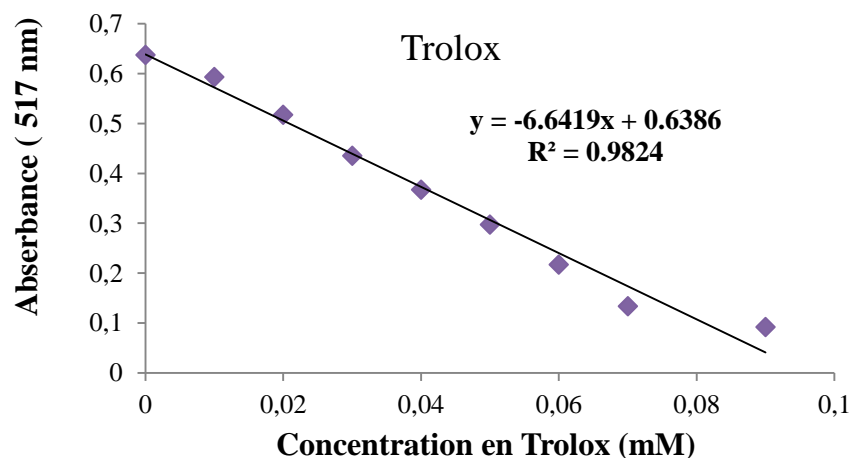


Figure 9 : Courbe d'étalonnage au Trolox pour le test du DPPH.

Par ailleurs, l'activité neutralisant le radical libre DPPH•, exprimées en terme de Capacité Antioxydante en Trolox Equivalent (TEAC) (figure 9), a révélé que l'extrait obtenu par infusion possède un potentiel antioxydant significativement ($P < 0.01$) plus important que ceux des extraits obtenus par macération et par Soxhlet (Figure 10).

D'autres études ont montré des valeurs plus élevées pour les extraits obtenus par macération et pour des extraits préparés par infusion (Meziani et al., 2019 ; Sarbaswarup *et al.*, 2019).

Ces différences pourraient être attribuées à la méthode d'extraction utilisée. La potentialité antioxydante de nos échantillons pourrait être due à leur richesse en composés phénoliques et à la diversité de ces composés. En effet, les flavonoïdes présentent une configuration structurale propice à la neutralisation des espèces radicalaires, du fait de la présence de multiples groupements hydroxyle agissant en tant que donneurs d'hydrogène, lesquels revêtent à leur tour une grande capacité antioxydante (Bendjabeur, 2012).

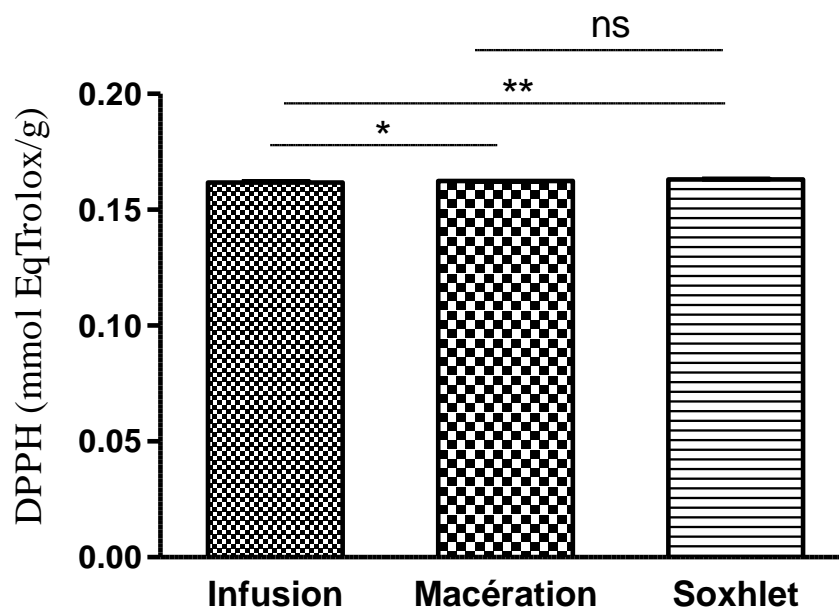


Figure 10 : Activité neutralisant le radical DPPH• par les différents extraits de la pelure de grenade.

III.3.2. Effet du piégeage du radical libre cationique 2,2'-azino-bis (3 éthylbenzo thiazoline-6-sulphonique (ABTS^{•+}))

L'activité antioxydante des extraits obtenus par infusion, macération et Soxhlet, a été également déterminée par le suivi de la réduction du radical cationique ABTS^{•+}. La capacité antioxydante des différents extraits analysés envers le radical ABTS^{•+} exprimée en termes de Capacité Antioxydante en Trolox Equivalent (TEAC) en mmol de trolox équivalent par gramme d'extrait sec (mmol TroloxEq/g d'extrait) comme montre le figure 11.

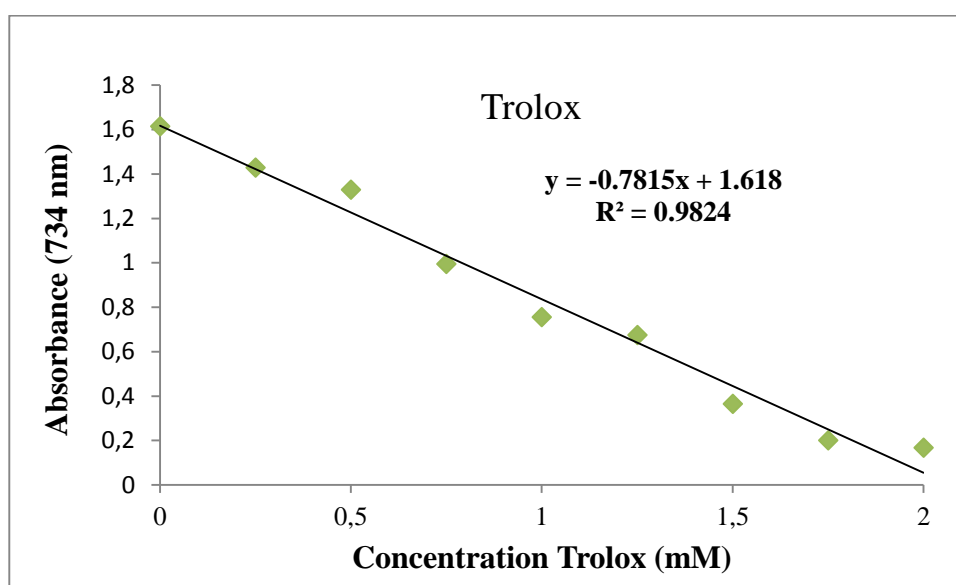


Figure 11 : Courbe d'étalonnage au Trolox pour le test d'ABTS.

A une concentration de 0.5 mg/ml, des pourcentages d'inhibition de l'oxydation du radical cationique ABTS^{•+} très élevés ont été obtenus pour les différents extraits d'infusion ($92.69 \pm 3.88\%$), de macération ($95.92 \pm 0.03\%$) et de Soxhlet ($93.30 \pm 4.31\%$). Par ailleurs, en TEAC, les valeurs obtenues sont de 3.84 ± 0.16 mmol Eq Trolox/g, 3.97 ± 0.001 mmol Eq Trolox/g et 3.97 ± 0.17 mmol Eq Trolox/g pour les extraits d'infusion, de macération et de Soxhlet respectivement. Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les différents extraits analysés (Figure 12). Une activité en TEAC de 1.07 ± 0.003 mmol Eq Trolox/g, a été retrouvée dans un extrait de la pelure de grenade préparé par infusion (Sarbaswarup *et al.*, 2019).

Des résultats obtenus, nous constatons aussi que, pour les trois méthodes d'extraction, la capacité antioxydante des extraits de la pelure de grenade est proportionnelle à la polarité des solvants utilisés. Les extraits des solvants polaires, hydroéthanolique pour la macération est donné la meilleure résultat suivis par l'extrait de soxhlet et l'infusion, résultant de l'emploi

du mélange de solvants éthanol-eau lors de la macération, cette approche présente des avantages notables. L'inclusion de l'eau dans le solvant accroît sa polarité, ce qui engendre l'extraction préférentielle de molécules polaires. Des études présentes dans la littérature appuient nos propositions et indiquent que l'inclusion d'eau dans les solvants mélangés accroît la perméabilité des tissus végétaux. De plus, cette présence d'eau favorise le processus de diffusion de masse lors de l'étape d'extraction (Arimboor et Arumugan, 2011 ; Trabelsi *et al.*, 2010). Cela renforce la notion que la composition qualitative des molécules présentes dans l'extrait peut jouer un rôle déterminante. Par conséquent, les caractéristiques telles que l'activité antioxydante et la concentration des phénols dans un extrait sont étroitement liées au processus d'extraction utilisé, ainsi qu'à la nature et à la polarité du solvant employé.

Notre étude a mis en évidence l'importance de choix de la méthode d'extraction au sein d'une recherche de valorisation des plantes, étape essentielle pour obtenir les composés actifs souhaités.

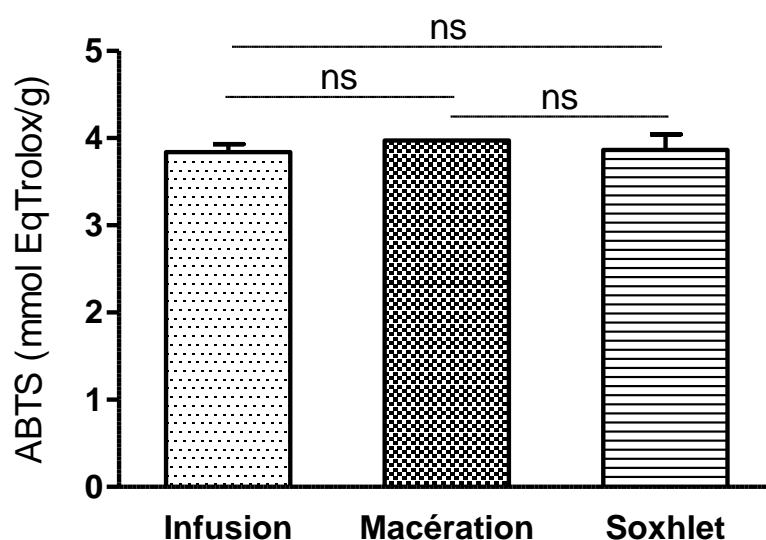


Figure 12 : Activité neutralisant le radical $ABTS^{++}$ par les différents extraits de la pelure de grenade.

Les valeurs d'activité antioxydante mesurées à l'aide du test au radical libre DPPH sont inférieures à celles obtenues par la méthode utilisant le radical ABTS. Cette disparité pourrait être rationnellement attribuée à la présence de composés chimiques qui manifestent des bandes d'absorption à une longueur d'onde similaire à celle du radical DPPH'. En conséquence, cela pourrait engendrer une élévation de l'absorbance mesurée (Sarr *et al.*, 2015).

III.3.3. Évaluation du potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer des extraits d'infusion, de macération et de Soxhlet de la pelure de grenade a été évalué en utilisant la méthode de FRAP. C'est un essai simple, rapide et reproductible. Les valeurs du pouvoir antioxydant réducteur du fer de chaque extrait analysé (0.5 mg/ml) sont exprimés en mmol équivalents de Fe^{2+} par gramme d'extrait (mmol Eq Fe^{2+} /g d'extrait), ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage au FeSO_4 (Figure 13).

Les résultats obtenus ont révélé que le pouvoir réducteur de l'extrait obtenu par infusion (2.80 ± 0.02 mmol Eq Fe^{2+} /g) est significativement plus élevé que celui de l'extrait obtenu par Soxhlet (2.82 ± 0.006 mmol Eq Fe^{2+} /g, $P < 0.001$) et par macération (2.81 ± 0.02 mmol Eq Fe^{2+} /g, $P < 0.01$).

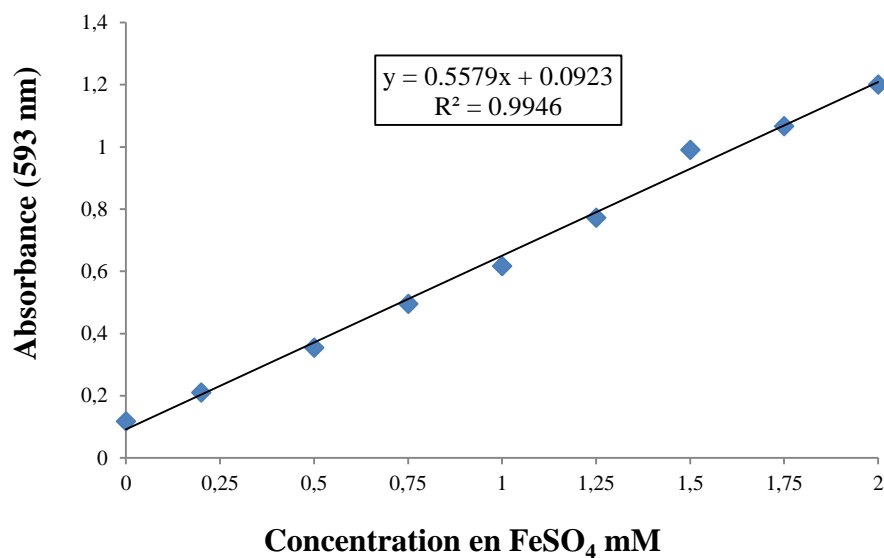


Figure 13 : Courbe d'étalonnage au FeSO_4 pour le test du FRAP.

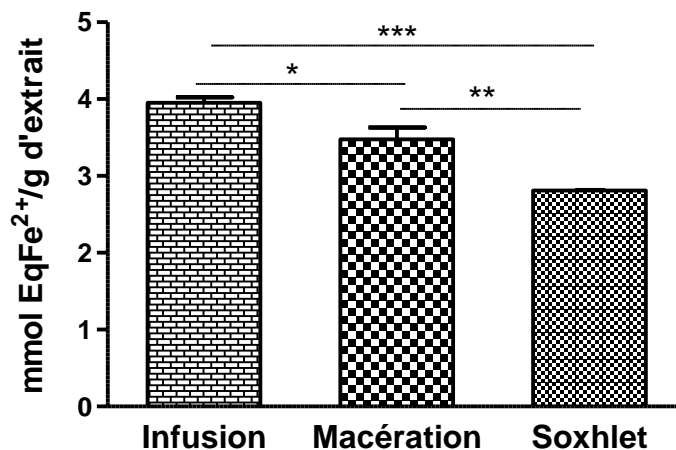


Figure 14 : Potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP) des différents extraits de la pelure de grenade.

Le potentiel réducteur du fer peut être principalement lié aux composés phénoliques antioxydants à la fois hydrophiles et hydrophobes. Ces composés agissent en tant qu'espèces donneuses d'électrons efficaces, capables de neutraliser les réactions en chaîne des radicaux libres en les convertissant en produits plus stables (Zou *et al.*, 2004). Cette réaction peut être inhibée par les composés phénoliques notamment les flavonoïdes qui ont la capacité de former des complexes stables avec les ions métalliques grâce à leurs groupements fonctionnels (Van Acker *et al.*, 1996).

A la lumière des résultats obtenus du pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP), l'extrait préparé par infusion a montré un meilleur effet réducteur du fer. Cette caractéristique offre la possibilité d'inhiber la catalyse par ces cofacteurs métalliques tels que le fer et le cuivre impliqués dans la génération de radicaux libres (Balasundram *et al.*, 2006).

Conclusion

III. Conclusion

Les pelures de grenade sont des sous-produits naturels de valeur extrêmement précieuse en raison de leurs teneurs élevées en polyphénols, composés réputés pour leurs propriétés antioxydantes bénéfiques pour la santé. Dans cette étude, trois méthodes d'extraction conventionnelles, à savoir l'infusion, la macération et le Soxhlet, ont été comparées pour évaluer leur efficacité dans l'extraction des composés bioactifs de la pelure de grenade.

Les résultats de l'étude ont révélé que l'extrait de macération présentait la plus haute teneur en polyphénols totaux, suivi de l'infusion puis du Soxhlet. Les flavonoïdes étaient présents à des niveaux similaires dans les extraits de macération et d'infusion, tandis que l'extrait de Soxhlet avait une teneur plus faible. En ce qui concerne les tanins condensés, les trois méthodes d'extraction ont donné des extraits contenant des quantités similaires en tanins condensés.

Par ailleurs, tous les extraits ont démontré une capacité à neutraliser les radicaux libres DPPH• et ABTS•+, indiquant ainsi que chacune des méthodes d'extraction utilisée permet d'obtenir des extraits à potentiel antioxydant. L'infusion s'est distinguée en montrant un meilleur effet neutralisant du radical DPPH• et une forte capacité antioxydante réductrice du fer par rapport aux extraits de macération et de Soxhlet.

En termes de rendements d'extraction, la méthode Soxhlet a été la plus performante, suivie de l'infusion et de la macération. Ces rendements sont souvent importants pour l'industrie, car ils déterminent la quantité d'extrait obtenu à partir des matières premières.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats ont montré que l'extraction par macération semble être la méthode la plus efficace pour obtenir des extraits riches en polyphénols totaux à partir de la pelure de grenade. Cependant, l'infusion s'est démarquée par une capacité antioxydante réductrice du fer plus élevée, ce qui la rendrait plus appropriée pour certaines applications spécifiques nécessitant une forte activité antioxydante. Une analyse plus approfondie des extraits étudiés permettrait une meilleure comparaison entre les méthodes d'extractions utilisées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adhami V, Khan N and Mukhtar H. Cancer chemoprevention by pomegranate: Laboratory and clinical evidence. *Nutrition and Cancer* 2009; 61(6): 811–15.
- Adsule R, Patil N. Pomegranate. In: Salunkhe DK, Kadam SS (Eds) *Handbook of Fruit Sciences and Technology Production, Composition, Storage and Processing*, Marcel Dekker, New York, printed at Brijbasi Art Press Ltd, UP, India 2005: 455-464.
- Akpınar-Bayızit A, Özcan T and Yılmaz-Ersan L. 2012. The therapeutic potential of pomegranate and its products for prevention of cancer. In *Cancer prevention – From mechanisms to translational benefits*, Chapter 13, ed. A. G. Georgakilas. InTech. ISBN: 978- 953-51-0547–3.
- Alexandre M. Optimization of mechanical behavior of PEKK / Carbon fibers structural composites by PEKK oligomers sizing 2017.
- Ali U, Kumar P. Effect of Soxhlet and Ultrasound assisted extraction on antioxidant activity of pomegranate peel extract. *International Journal of Food and Nutritional Sciences* 2014; 3(6): 256-270.
- Al-Said F, Opara L, Al-Yahyai R. Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum L.*) grown in the Sultanate of Oman, *J Food Eng* 2009; 90: 129-134 .
- Ameer K, Shahbaz H, Kwon J. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf* 2017;16:295–315.
- Amri Z, Zaouay F, Lazreg-Aref H. Phytochemical content, fatty acids composition and antioxidant potential of different pomegranate parts: comparison between edible and non-edible varieties grown in Tunisia. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017; 104: 274–280.
- Anne S, Nogaret E. *La phytothérapie: se soigner par les plantes*. Ed, Groupe Eyrolles 2003:25-29.
- Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free*
- Arimboor R and Arumughan C. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) proanthocyanidins inhibit in vitro enzymatic hydrolysis of protein. *J. Food Sci* 2011; 76(6):130-7.

Références bibliographiques

- Arts IC, Hollman PC, Am J, Clin, Nutr. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81:317–325.
- Azmir A, Zaidul I. Rahman M, Sharif K, Mohamed A. Sahena F, Jahurul M, Ghafoor K, Norulaini N, Omar, A. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review 2013; 117(4) :426-436
- Baharun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Inkas M, Uycky M, Gazin M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim-Forsch* 1996; 46: 1086-1094.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *food chemistry* 2006 ;99 :191–203.
- Baydar N, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2006, 41, 799–804.
- Bendjabeur S. Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade *punica granatum* l.) en vue de leur utilisation alimentaire. *ENSA* 2012 : 80-95
- Benzie I, Strain J. Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299:15-27.
- Bertelli A, Biagi M, Corsini M, Baini G, Cappellucci G, Miraldi E. Polyphenols: From Theory to Practice. *Foods* 2021;10: 2595.
- Bessa LJ, Fazly Bazzaz BS and Javanmardi F. Antimicrobial activity of polyphenols against *Staphylococcus aureus*-a systematic review. *Pathogens* 2020;9(6):452.
- Braga L, Leite A, Xavier G, Takahashi J, Bemquerer M, Chartone-Souza E, Nascimento AMA. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology* 2005; 51(7) : 541-547.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 1998; 56: 317–333.
- Casquete R, Castro S, Martín A. Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2015 ;31: 37–44.

Références bibliographiques

- Chen W, Liu Y, Li H, Luo S, Liu R, Zhang R and Chen H. Mechanisms of antivirulence and antibiofilm functions by quercetin and its derivative quercetin-3-O-glucuronide against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of global antimicrobial resistance* 2018; 12 :42-50.
- Cheng YY, Li Y and Hou XJ. Herbal medicine for adult attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Conde E, Cara C, Moure A, Ruiz E, Castro, E and Dominguez H. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry* 2015; 114 (3): 806 – 812.
- Cushnie TP and Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents* 2005; 26(5): 343-356
- Dahham S, Ali M, Tabassum H and Khan M. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum L.*), *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 2010 ; 9(3) : 273–281..
- Daniel S, Fabricant and Norman RF. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*•VOLUME109 |SUPPLEMENT1 |March 2001
- Dastager G, Syed, Dayanand A, Ashok P. Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009;36:189–194
- Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen P L, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S and Ju YH. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 2014;22(3): 296-302.
- Ecribano B, Santos B. Polyphenols extraction from foods. In *Methods in polyphenol analysis*. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Science, 2003.
- Eghbali S, Fatemeh S, Razieh A and Sahebkar. Therapeutic Effects of *Punica granatum* (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. Volume 2021, Article ID 5297162, 22 pages.
- Elfalleh W, Tlili N, Nasri N. “Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits,” *Journal of Food Science* 2011 ;76(5) : C707–C713.
- Erkan M, Kader A. University of California, Davis, USA Pomegranate (*Punica granatum L.*) 2011;288

Références bibliographiques

- Ge S, Duo L, Wang J, Yang J, Li Z, Tu Y. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of ethnopharmacology* 2021; 271: 113877.
- Gil MI, Cherif J, Ayed N, Artes F and Tomas-Barberan FA. 'Influence of cultivar, maturity stage, and geographical location on the juice pigmentation of Tunisian pomegranates', *Z Lebensm Unters Forsch* 1995;201 : 361 – 364 .
- Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Dami TE, Luccarini I, Traini C, Failli P, Berti A, Casamenti F, Stefani M. The Polyphenol Oleuropein Aglycone Protects TgCRND8 Mice against A β Plaque Pathology. *PLoS ONE* 2013, 8, e71702
- Grosso G, Stepaniak U, Micek A, Topor-Madry R, Pikhart H, Szafraniec K and Pajak A. Major diet-driven differences in proneness to obesity among European populations. *Obesity* 2014 ;22(12):2544-2550.
- Gullón P, Astray G, Gullón B, Tomasevic I, Lorenzo JM. Pomegranate Peel as Suitable Source of High-Added Value Bioactives: Tailored Functionalized Meat Products. *Molecules* 2020; 25:2859.
- Haj AM, Alokiah BA, Badr ADR. In vitro antibacterial effects of pomegranate fruit peel infusion against two diarrheagenic bacteria 2018; 56(4)203-206.
- Handa S, Khanuja S, Longo G, Rakesh D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trieste 2008: 260 .
- Hannah Cory, Passarelli S, John Szeto, Martha Tamez 1 and Josiemer Mattei. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* 2018; 5: article 87.
- Hodgson R W (1917).The Pomegranate , Bulletin No. 276 , University of California Press , Berkeley, CA .
- Holland D, Hatib K and Bar YI .'Pomegranate: Botany, horticulture, breeding' , *Hort Rev* 2009;35 :127 – 191.
- Hornung E, Pernstich C and Feussner I. Formation of conjugated $\Delta^{11}\Delta^{13}$ -double bonds by Δ^{12} -linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *European Journal of Biochemistry* 2002; 269(19):4852-4859.
- Huang TH, HYang Q, Harada M, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis B.D, Li Y., Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of

Références bibliographiques

- cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2005c; 46: 856–862.
- Ismail T, Akhtar S, Sestili PM, Riaz A, Ismail RG. “Antioxidant, antimicrobial and urease inhibitory activities of phenolics-rich pomegranate peel hydro-alcoholic extracts,” *Journal of Food Biochemistry* 2016 ;40(4): 550–558.
- J. Ethnopharmacol.* 2003 ;89 : 295–300.
- Jinnawat M, Korakod I, Kanok-Orn I, Global. Antioxidant Activity and Bioefficacy of Pomegranate *Punica granatum* Linn. Peel and Seed Extracts *Journal of Pharmacology* 2012;6(2): 131- 141
- Jung HJ, Hwang IA, Sung WS, Kang H, Kang BS, Seu YB, Lee DG. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch. Pharm. Res* 2005; 28:557–560
- Kandylis P, Kokkinomagoulos E. Food applications and potential health benefits of pomegranate and its derivatives. *Foods* 2020,9, 122.
- Kanwal Q, Hussain I, Siddiqui LH, Javaid A. Antimicrobial Activity Screening of Isolated Flavonoids from *Azadirachta Indica* Leaves. *J. Serb. Chem. Soc.* 2011; 76: 375–384. [CrossRef]
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci* 2004; 96: 229–245
- Kumari A, Dora J, Kumar A, & Kumar A. Pomegranate (*Punica granatum*) – overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences* 2012; 1: 1218–1222.
- La Rue J H (1980). Growing pomegranates in California, UC Fruit and Nut Research Information Center. Available from: http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/crops/pomegranate_factsheet.shtml [accessed 2 April, 2010]
- Lamy E, Pinheiro C, Rodrigues L, Capela-Silva F, Lopes O, Tavares S, Gaspar R. Determinants of Tannin-Rich Food and Beverage Consumption: Oral Perception vs. Psychosocial Aspects; Nova Publishers: New York, NY, USA, 2016
- Langley P (2000) why a pomegranate. *British Medical Journal* 321, 1153
- Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol* 2007; 109: 177-206.
- Levin GM. *Pomegranate Roads: a Soviet Botanist's Exile from Eden*, Floreant Press, Forestville, California 2006: 15-183.
- Li AN, Sha L, Yu JZ, Xiang RX, Yu MCBL. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* 2014; 6: 6020-6047

Références bibliographiques

- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 2007 ; 102: 771-776.
- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J and Cheng S. Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. *Food Chemistry* 2006 ;96(1- 2): 254-260
- Lien EJ, Ren S, Bui HH, wang. quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *free radic. biol. Med* 1999; 26: 285-294.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, & Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79(5): 727-747.
- Maryam Z, Farrukh A, Lqbal A. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum L.* peel extracts. *ELSEVIER* 2010;703: 99-107.
- Mercurio MD, Damberg RG, Herderich MJ, Smith PA. High throughput analysis of red wine and grape phenolics – adaption and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *J. Agric. Food Chem* 2007; 55: 4651-4657.
- Meziani S, Labga L, Menadi N, Tehami W, Z Benattouche Z, Saidani S, Benguella R, Benali M. Evaluation of bioactive properties and antioxidant capacity of native and imported pomegranate fruit bark (*Punica granatum L.*) cultivars found in Algeria. *International Journal of Research in BioSciences* 2019; 8(3): 1-14.
- Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elfakira C. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of seabuckthorn (*Hippophaë rhamnoides L.*) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry* 2012; 131(3): 754-760.
- Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 2005; 21: 389–394.
- Mokhnache K, Madoui S, Khither H, Soltani E, Charef N, Arrar L. Synthesis, characterization, hydrolytic cleavage, and biological activity studies of 2-[(1e)-N-{2- [(2- {(Z)-[1-(2-hydroxyphenyl) ethylidene] amino}ethyl) amino]ethyl} ethanimidoyl] phenol, *JDDT* (2019) :25-29.
- Mund SS, Patil VK, Chavan SD. Standardization of leaf sampling procedure in pomegranate (*Punica granatum Linn.*). *J Maharashtra agric Univ Coll Agric* 1980;5(1):90-91.

Références bibliographiques

- Naczki M Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA Technomic Publishing Co Inc 1995
- Natalello A, Hervás G, Toral PG, Luciano G, Valenti B, Mendoza AG, Pauselli M, Priolo A, Frutos P. Bioactive compounds from pomegranate by-products increase the in vitro ruminal accumulation of potentially health promoting fatty acids. *Anim. Feed Sci. Technol* 2020; 259: 114355. [CrossRef]
- Natalia M, Ioannis S, Victoria S. Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants volume 3: The Science of Beverages 2019: 283-314
- Nazeam JA, AL-Shareef WA, Helmy MW, El-Haddad AE. Bioassay-guided isolation of potential bioactive constituents from pomegranate agrifood by-product. *Food Chem.* 2020; 326: 126993. [CrossRef]
- Newman RA, Lansky EP, Block ML. Pomegranate: The Most Medicinal Fruit (1st Edn), Basic Health Publication, Laguna Beach, CA 2007: 1-120
- Ofofu FK, Daliri EBM, Elahi F, Chelliah R, Lee BH, Oh DH. New Insights on the Use of Polyphenols as Natural Preservatives and Their Emerging Safety Concerns. *Front. Sustain. Food Syst* 2020; 4: 223.
- Paladini AC, Marder M, Viola H, Wolfman C, Wasowski C, Medina J H. Flavonoids and the central nervous system: From forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J. Pharm. Pharmacol* 1999;1: 519–526.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Med. Cell. Longev* 2009; 2: 270-278.
- Patel, C. Dadhaniya, P. Hingorani, L. Soni, M, Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies, *Food Chem. Toxicol* 2008; 46: 2728–2735.
- Pereira DM, Valentão P, Pereira J A, Andrade P B. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* 2009; 14: 2202–2211.
- Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability. *Ann.-Ist. Super. Sanita.* 43: 348.
- Popovici C, Saykova I., & Tylkowskib. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* 2010; (4): 1– 8.
- Pranav P, Kalelkar M R & Andrés J, García. Biomaterial-based antimicrobial therapies for the treatment of bacterial infections. *Nature Reviews Materials* 2022;7 :39–54

- Prasad S, & Aggarwal B. Bioactive molecules derived from the spice turmeric targeting inflammatory pathways in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2011; 768(1): 67-79.
- Ranjha MMAN, Amjad S, Ashraf S, Khawar L, Safdar MN, Jabbar S, Nadeem M, Mahmood Sh, Murtaza MA. Extraction of polyphenols from apple and pomegranate peels employing different extraction techniques for the development of functional date bars *International journal of fruits sciences* 2020; 20(S3) : S1201.
- Rathod NB, Elabed N, Punia S, Ozogul F, Kim S-K, Rocha JM. Recent Developments in Polyphenol Applications on Human Health: A Review with Current Knowledge. *Plants* 2023; 12: 1217.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans CA. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999 ; 26 : 1231-1237.
- Ribereau-Gayon J, peynaud E. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Édition Dunod, Paris. France 1968 : 254 p.
- Rizvi SI, Mishra M. Anti-oxidant effect of quercetin on type 2 diabetic erythrocytes. *J Food Biochem* 2009; 33:404-15.
- Roukas T, Kotzekidou P. Pomegranate peel waste: A new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res* 2020; 27: 13105–13113.
- Ryan MT, Muller H, Pfanner N. Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J BiolChem* 1999 ; 274 (29):20619- 20627.
- Sánchez-Moreno C. Polyphenolic Compounds: Structure and Classification; Presence in Foods and Consumption; Bioavailability and Metabolism. *Alimentaria* 2002; 329: 19-28.
- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super. Sanita* 2007; 43: 394–405
- Sarbaswarup G, Jayanta K C, Banti C and Alok K H. Comparison of different aqueous extraction methods for optimum extraction of polyphenols and in-vitro anti-oxidant activity from pomegranate peel. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2019; 8(3): 342-347.
- Sarr SO, Fall AD, Gueye R, Diop A, Diatta K, Diop N, NDiaye B, Diop YM. Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci* 2015; 9(3): 1263-1269. DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i3.11>

Références bibliographiques

- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 2073S-2085S.
- Shahidi F, Varatharajan V, Oh W.Y, Peng H. Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects. *J. Food Bioact.* 2019 ;5: 57–119.
- Shahr Babaki B. Genetic Diversity of Pomegranate Genotypes in Iran. Karaj, Iran: Agriculture Education Publication; 1997.
- Singh D B , Samadia D K and Kingsly A R P (2006), ‘Conservation, characterization and evaluation of pomegranate germplasm under arid ecosystem of India’ , in ISHS 1st Int. Symp, Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits , Adana, Turkey .
- Singh B, Singh J.P, Kaur A, Singh N. Antimicrobial potential of pomegranate peel: A review. *Int. J. Food Sci. Technol* 2019, 54:959–965.
- Singh B, Singh J, Kaur A, Singh N. “Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: a review,” *Food Chemistry* 2018 ; 261: 75–86.
- Soobrattee M.A, Neergheen V.S, Luximon-Ramma A, Aruoma O.I, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen* 2005; 579: 200–213.
- Sousa R, Dias S, & Antunes C. Spatial subtidal macrobenthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia* 2006 ;559:135 -148.
- Stojanovic, K. Savikin, N. Djedovic. “Pomegranate peel extract ameliorates autoimmunity in animal models of multiple sclerosis and type 1 diabetes. *Journal of Functional Foods* 2017;35: 522–530.
- Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem* 1998; 4: 4267-4274.
- Tambun R. Alexander V. Ginting Y.(2020). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review 1122 (2021) 012095
- Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H , Oueslati S, Soumaya B, Hajlaoui H, et Abdelly C. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT* 2010: 1-8.
- Tsuyuki H, Ito S, Nakatsukasa Y. Lipids in pomegranate seeds, *Nihon Daigaku No-Juigakubu Gakujutsu Kenkyu Hokoku* 1981; 38: 141

Références bibliographiques

- Turrini F, Zunin P, Catena S, Villa C, Alfei S, Boggia R. Traditional or hydro-diffusion and gravity microwave coupled with ultrasound as green technologies for the valorization of pomegranate external peels. *Food Bioprod.*2019; 117:30-37.[CrossRef]
- Van Acker S. A. B. E, Van Den Berg D, Tromp M. N. J. L, Griffioen D. H, Van Bennekom W. P, Van Der Vijgh, W. J. F, & Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;20(3): 331–342.
- Verena S, Henryk D, Karl S, Mario L. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 2007: 348–358
- Vidal A, Fallarero B, Peña R, Medina M.E. Gra, B F, Rivera, Y. Gutierrez, P.M.
- Viswanath, M Sridevi, P Bhagavan, B Kumar, K. Ravindra.Subbaramamma, P. Toxicological, Pharmacological and Cellular properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2019; 8(2): 172-176.
- Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf* 2009; 9 (6): 635-654.
- Vuorela. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L (Punicaceae) whole fruit extracts.
- Wang Z, Pan Z, Ma H, Atungulu G. Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal.* 2011; 5:17-15.
- Yao L, Jiang Y, Shi J, Tomás-Barberán F. A. Datta N. Singanusong, R. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*, 59(3), 113-122). *BioSciences* 2019; 8(3): 1-14 (2019) *Sciences*, 8(3): 1-14 (2019).
- Zand R.S, Jenkins D.J, Diamandis E.P. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res* 2000; 62: 35–49.
- Zaouay F, Mena P, Garcia-Viguera C, Mars M. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products* 2012; 40:81-89.
- Zhou J, Xie G, Yan X. Targeting Quorum Sensing System to Combat Bacterial Biofilms. *Current Medicinal Chemistry* 2019; 26(32): 5918-5935.
- Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J. Agric. Food Chem* 2004 ; 52(16) :5032–5039

Résumé

La pelure de grenade représente l'un des sous-produits naturels les plus précieux en raison de sa teneur élevée en polyphénols. Ces composés sont traditionnellement extraits des matières végétales en utilisant diverses méthodes conventionnelles. Ce travail est une étude comparative de trois méthodes d'extraction conventionnelles qui sont l'infusion, la macération et Soxhlet. Les teneurs en composés bioactifs (polyphénols, flavonoïdes et tanins) ont été évaluées dans chaque extrait. Ensuite, l'activité antioxydante de ces extraits a été analysée par la méthode du piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS^{•+} et l'évaluation du potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP). Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de macération présente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (340.09 ± 22.88 mg EAG/g d'extrait sec). Pour les flavonoïdes, les extraits de macération et d'infusion ont montré des teneurs similaires, tandis que l'extrait obtenu par Soxhlet a affiché une teneur plus faible (12.54 ± 0.09 mg EQ/g d'extrait sec). Par ailleurs, les extraits obtenus par les trois méthodes d'extraction ont montré des teneurs similaires en tanins condensés (~ 3 mg EC/g d'extrait sec). L'analyse de l'activité antioxydante a montré que tous les extraits ont la capacité de neutraliser les radicaux libres DPPH[•] et ABTS^{•+}. De plus, l'évaluation du potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP) a montré que l'extrait obtenu par infusion avait la plus forte capacité antioxydante (4.01 ± 0.12 mmol Eq.Fe²⁺/g d'extrait) par rapport aux extraits de macération et de Soxhlet. Une analyse plus approfondie des extraits étudiés permettrait une meilleure comparaison entre les méthodes d'extractions utilisées.

Les mots clé : pelures de grenade, macération, infusion, Soxhlet, polyphénols, activité antioxydante.

Abstract

Pomegranate peel is one of the most valuable natural by-products due to its high polyphenol content. These compounds are traditionally extracted from plant materials using various conventional methods. This work is a comparative study of three conventional extraction methods which are infusion, maceration and Soxhlet. The levels of bioactive compounds (polyphenols, flavonoids and tannins) were evaluated in each extract. Then, the antioxidant activity of these extracts was analyzed by the DPPH and ABTS^{•+} free radical scavenging assays and the evaluation of the iron reducing antioxidant power (FRAP). Our results showed that the maceration extract has the highest total polyphenols content (340.09 ± 22.88 mg EAG/g dry extract). However, flavonoids contents were similar in maceration and infusion extracts. Whereas, the extract obtained by Soxhlet showed a lower content (12.54 ± 0.09 mg EQ/g of dry extract). In addition, the extracts obtained by the three extraction methods showed similar contents of condensed tannins (~ 3 mg EC/g of dry extract). Antioxidant activity analysis showed that all extracts have the ability to neutralize DPPH[•] and ABTS^{•+} free radicals. In addition, the evaluation of the antioxidant iron reducing power (FRAP) showed that the extract obtained by infusion had the highest antioxidant capacity (4.01 ± 0.12 mmol Eq.Fe²⁺/g extract) compared to maceration and Soxhlet extracts. Further analysis of the studied extracts would allow a better comparison between the different extraction methods.

Keywords: pomegranate peels, maceration, infusion, Soxhlet, polyphenols, antioxidant activity.