

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa

Faculté des Science de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée



Réf :.....

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Optimisation d'un procédé d'extraction assistée par
ultrasons des composés phénoliques de la pelure de grenade**

Présenté par :

M^{elle} AIT MOUHOUB Kahina & M^{elle} BENYOUB Taous

Soutenu le : 10 septembre 2023

Devant le jury :

M^{me} AOUDIA H.

MCB

Président.

M^{me} ABDELOUHAB K.

MCB

Encadrant.

M^{me} ARKOUB L.

MAA

Examineur.

Année Universitaire : 2023/2024.

Dédicace

A mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être, vous êtes toujours là pour m'encourager, vous êtes la raison de ma réussite dans la vie. Ce modeste travail est le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie.

Je ne pourrai jamais exprimer ma profonde gratitude ma chère sœur Sonia et mon adorable nièce Rosa Nelya, Merci d'être toujours à mes côtés et pour votre amour.

A toute ma chère famille en particulier ma grand-mère mon soutien moral et mon bonheur que Dieu te garde en bonne santé.

A tous mes amies Kanza, Inès, Mayssa, Lyna avec qui j'ai vécu des beaux moments.

A ma chère binôme Kahina que j'aime. Je te remercie d'avoir rendu ce travail agréable.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce Mémoire

Taous

Dédicace

A la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore, mon exemple éternel, mon soutien moral, celle qui a toujours sacrifié pour me voir réussir.

A toi mon père que Dieu te garde dans son vaste paradis.

A mes chers tantes merci pour leurs encouragements permanents.

A toute ma chère famille en particulier mes chers grands parents pour votre amour, encouragements et soutien moral, que Dieu vous garde en bonne santé.

A mes chers amies, mon binôme Taous qui m'a accompagné tout au long de cette année pour la réalisation de ce travail.

A mes chers amis merci pour leur soutien tout au long du projet.

Kahina

Remerciements

Au terme de ce travail, nous remercions Dieu pour la force qu'il nous a donné pour accomplir ce travail.

Nous adressons nos profonds remerciements à **M^{me} ABDELOUHAB Katia** pour nous avoir encadré avec efficacité. Nous vous remercions sincèrement et de tout cœur pour votre patience, votre aide sans limites et votre disponibilité sans relâches sans lesquelles ce travail n'aurait pu voir le jour. Vous nous avez soutenu jusqu' à la dernière minute, un soutien et une attention qu'on n'oubliera jamais. Nous vous exprimons ici toute notre gratitude et notre reconnaissance pour ce que vous avez fait pour finaliser ce travail.

Nos remerciements sont également adressés aux membres du jury **M^{me} AOUDIA H.** et **M^{me} ARKOUB L.** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail en acceptant de l'examiner et de l'enrichir.

Nous remercions également les techniciennes de laboratoires au bloc 12, Mme **Mammas H** et Mme **Saadi-Ahmed L** pour leur assistance technique.

Nous remercions tous nos enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie qui nous ont enseignés durant ces cinq années dans un climat fraternel.

Un grand merci à nos familles pour leur amour et leur soutien constant.

AIT MOUHOU B K. & BENYOUB T.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

| | |
|---------------------------|---|
| Introduction | 1 |
|---------------------------|---|

Partie I : Rappels bibliographiques

| | |
|--|---|
| I. Généralités sur la grenade | 2 |
|--|---|

| | |
|--|---|
| I.1 Description générale du grenadier..... | 2 |
|--|---|

| | |
|---|---|
| I.2 Nomenclature et classification botanique..... | 3 |
|---|---|

| | |
|--|---|
| I.3 Usage traditionnel et propriétés thérapeutiques..... | 4 |
|--|---|

| | |
|--------------------------------|---|
| I.3.1 Usage traditionnel | 4 |
|--------------------------------|---|

| | |
|---------------------------------------|---|
| I.3.2 Propriétés thérapeutiques | 5 |
|---------------------------------------|---|

| | |
|--|---|
| I.4 Composition chimique de <i>Punica Granatum</i> | 6 |
|--|---|

| | |
|---|---|
| II. les composés phénoliques | 7 |
|---|---|

| | |
|----------------------|---|
| II.1 Définition..... | 7 |
|----------------------|---|

| | |
|--|---|
| II.2 Classification des polyphénols..... | 8 |
|--|---|

| | |
|--------------------------------------|---|
| II .2.1 les acides phénoliques | 9 |
|--------------------------------------|---|

| | |
|------------------------------|----|
| II.2.2 Les flavonoides | 10 |
|------------------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| II.2.3 les tanins..... | 11 |
|------------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| - Les stilbènes..... | 12 |
|----------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| - les lignanes | 12 |
|----------------------|----|

| | |
|--|----|
| II.3 Propriétés biologiques des polyphénols..... | 13 |
|--|----|

| | |
|-------------------------------------|----|
| II.3.1 Activité anti oxydante | 13 |
|-------------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| II.3.2 Activité anti inflammatoire | 14 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| II.3.3 Activité anti bactérienne, anti fongique et anti virale | 15 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| III. Méthodes d'extraction non conventionnelles | 16 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| III.1 Extraction assistée par micro –onde | 16 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| III.2 Extraction assistée par ultrasons..... | 17 |
| III.3 Extraction assistée par fluide supercritique..... | 19 |

Partie II : Partie expérimentale

| | |
|---|-----------|
| II. Materiel et Méthodes..... | 20 |
| II.1 Matériel..... | 20 |
| II.2 Méthodes..... | 21 |
| II.2.1 Optimisation de l'extraction assistée par ultrasons des polyphénols..... | 21 |
| II.2.2 Préparation de l'extrait optimisé..... | 22 |
| II.3 Evaluation de l'activité antioxydante..... | 24 |
| II.4 Analyse statistique | 26 |

Partie III : Résultats et discussion

| | |
|--|-----------|
| III.1 RESULTATS ET DISCUSSION..... | 27 |
| III.1.1 Détermination du ratio solide/liquide..... | 27 |
| III.1.2 Détermination de l'intervalle de temps d'extraction..... | 28 |
| III.1.3 Effet de la concentration du solvant..... | 29 |
| III.1.4 Effet d'amplitude ultrasonique..... | 30 |
| III.1.5 Effet du temps d'extraction..... | 32 |
| III.2 Contenu en polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés..... | 33 |
| III.2.1 Teneur en polyphénols totaux | 33 |
| III.2.2 Teneur en flavonoïdes totaux..... | 34 |
| III.2.3 Teneur en tanins condensés..... | 34 |
| III.3. Etude de l'activité antioxydante..... | 34 |
| III.3.1 Activité anti-radicalaire DPPH et ABTS..... | 35 |
| III.3.2 Pouvoir antioxydant réducteur du fer(FRAP)..... | 36 |
| Conclusion et perspectives | 37 |
| Références bibliographiques..... | 39 |

Annexe

Liste des abréviations

ABTS : 2,2'-azino-bis (3 éthylbenzo thiazoline-6-sulphonique).

ADN : acide désoxyribonucléique.

ATP : adénosine triphosphate.

COX1 : cyclooxygénase 1.

COX2 : cyclooxygénase 2.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

ERO : espèceq réactiveq de l'oxygène.

ESAM : extraction par solvant assistée par micro-ondes.

FRAP : pouvoir antioxydant réducteur du fer.

HPLC : chromatographie liquide à haute performance.

IL- : interleukine.

iNOS : monoxyde d'azote synthase inductible.

LOX : lipoxgénase.

LPS : lipopolysaccharide.

MAE : extraction assistée par micro-onde.

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NFkB : facteur nucléaire kappa-B.

NLRP3 : famille de récepteur de type NOD, le domaine pyrine contenant 3.

NO : monoxyde d'azote.

PI3 Kinase : phosphatidyl inositol 3 kinase.

PKC : protéine kinase C.

PTK : protéine tyrosine kinase.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

SFE : extraction assistée par fluide supercritique.

SOD : superoxyde dismutase.

Tc /HDL-c : lipoprotéines de haute densité-cholestérol.

UAE : extraction assistée par ultrasons.

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 01 : Différentes parties anatomiques du grenadier (<i>Punica granatum</i>) | 03 |
| Figure 02 : Les Principaux composés phénoliques de la grenade..... | 07 |
| Figure 03 : Classification des polyphénols..... | 08 |
| Figure 04 : Structures commune de l'acide benzoïque et acide hydroxy cinnamiques | 10 |
| Figure 05 : Structures de base des principales classes de flavonoïdes..... | 11 |
| Figure 06 : Type et Structure de base des tanins..... | 12 |
| Figure 07 : Structure chimique de stilbénes et de lignanes..... | 12 |
| Figure 08 : Représentation graphique de la technique MAE | 17 |
| Figure 09 : Représentation graphique de la technique UAE..... | 18 |
| Figure 10 : Représentation graphique de la technique SC-CO ₂ | 19 |
| Figure 11 : Effet de la concentration du solvant hydroéthanolique sur la teneur en polyphénols totaux extraits de la pelure de grenade..... | 29 |
| Figure12 : Effet de l'amplitude des ultrasons sur la teneur en polyphénols dans l'extrait de la pelure de grenade..... | 31 |
| Figure 13 : Effet du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de la pelure de grenade..... | 32 |

Liste des tableaux

| Tableau | Titre | Page |
|----------------|---|-------------|
| I | Appareils et réactifs utilisés. | 20 |
| II | Contenue en polyphenols totaux selon différents ratios soluté/solvant. | 27 |
| III | Teneurs en polyphenols totaux obtenus à différents temps de sonication (5s-5min). | 28 |
| IV | Teneurs en polyphénols totaux obtenus à différents temps (5-30min) de sonication. | 28 |
| V | Contenu en polyphenols totaux, en flavonoïdes totaux et en tanins condensés. | 33 |
| VI | Résultats des tests antiradicalaire DPPH et ABTS et du pouvoir réducteur de Fer (FRAP). | 35 |

Introduction

La plupart des espèces végétales possèdent des vertus thérapeutiques, qui agissent directement sur l'organisme (Khouchlaa *et al.*, 2017). Ces plantes ont été particulièrement étudiées pour leurs activités biologiques et leurs métabolites secondaires utilisés comme principes actifs ou comme modèle chimique pour la synthèse et la semi synthèse des médicaments (Ventrella et Marinho, 2008). Les polyphénols sont des métabolites secondaires que les plantes produisent en réponse aux agressions externes. Ils contribuent aussi à la pigmentation ainsi qu'aux caractéristiques organoleptiques (odeur et saveur) des fruits et légumes (Visioli *et al.*, 2000 ; Tsao, 2010). Au sein d'industrie agro alimentaire, Il a été démontré que les polyphénols alimentaires jouent un rôle important dans la santé humaine car ils présentent diverses propriétés bioactives telles que les activités antimicrobienne, antioxydante, anticancéreuse et anti-inflammatoire (Balwinder *et al.*, 2020).

L'extraction de principes actifs est une étape essentielle pour l'isolement des molécules bioactives. En effet, plusieurs méthodes d'extraction non conventionnelles ont été développées, telles que l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) et l'extraction assistée par ultrasons (EAU). Ces méthodes sont largement utilisées à la place des méthodes conventionnelles pour extraire les composés phénoliques, en raison de leurs avantages potentiels, tels que l'utilisation réduite de solvant, des rendements supérieurs, une réduction des résidus toxiques, une meilleure reproductibilité du processus et des temps d'extraction réduits (Selvamuthukumar et Shi, 2017 ; Alara *et al.*, 2021). De nombreuses études à travers le monde se sont orientées vers l'évaluation de produits naturels biologiquement actifs afin d'établir des règles scientifiques pour leur utilisation.

Dans ce contexte le fruit de *Punica granatum* (*Punicaceae*), avec ses diverses parties, notamment les graines et la pelure ont été démontré pour contenir des composés bioactifs à intérêt potentiel. Ce fruit a été longtemps utilisé en médecine traditionnelle, notamment pour le traitement de troubles gastro-intestinaux, cardiovasculaires et endocriniens (Enghabali *et al.*, 2021).

L'objectif de ce travail est d'optimiser un protocole d'extraction des composés phénoliques de la pelure de grenade. Le contenu en composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) de l'extrait optimisé a été déterminé puis une analyse de l'activité antioxydante antiradicalaire (DPPH et ABTS) et du pouvoir réducteur du fer de cet extrait a été effectuée.

Partie I : Rappels bibliographiques

I. Généralités sur la grenade

I.1 Description générale du grenadier

Le grenadier (Figure 1) est un arbre originaire du sud-est de l'Europe et de l'Asie, où il était cultivé dans l'Égypte ancienne, à Babylone, en Inde et en Iran et en Algérie. La grenade était largement cultivée en Espagne et a été apportée au Mexique et en Californie par des missionnaires au 16^{ème} siècle (Sheets *et al.*, 2004 ; khaldi *et al.*, 2021). C'est un arbre qui pousse bien dans un climat semi-aride tempéré doux à subtropical qui convient naturellement à la croissance et la fructification. Les grenadiers sont des arbustes pouvant atteindre 6 m de haut. Le tronc est recouvert d'écorce brun rougeâtre qui devient ensuite grise. Les branches sont raides, anguleuses et souvent épineuses favorisant ainsi une forte capacité d'absorption des nutriments de la racine. Ces arbres sont généralement à feuilles caduques et ont une longévité considérable (Kumari *et al.*, 2012 ; Bidri et Choay, 2016). Comme tout arbre fruitier, le grenadier comprend différentes parties dont les plus importantes sont, les feuilles, les fleurs et le fruit.

I.1.1 Feuille

Les feuilles du grenadier sont de couleur vert-brillant, elliptique et mesurent jusqu'à 3 cm de long (Figure 1-E) (Nhlanhla *et al.*, 2022). Elles sont coriaces, lancéolées, exstipulées, opposées et paires se croisant alternativement à angles droits. Certaines variétés ont 3 feuilles et même 4 feuilles par nœud dans l'arbre (Holland *et al.*, 2009 ; Kumari *et al.*, 2012).

I.1.2 Fleur

Les fleurs du grenadier sont composées de 5 à 8 pétales et mesurent plus de 2.5 cm de diamètre (Figure 1-B) (Kumari *et al.*, 2012). Au stade précoce, elles ont la forme de petites poires de couleur verte à la base, rouge à la pointe ou partout rouge foncé. Les fleurs matures développent la couleur des sépales rouge orangé à rouge foncé selon les variétés. Les pétales sont rouge orangé ou rose, rarement blanc. Elles peuvent apparaître en grappes, solitaires ou paires (Wang, 2003 ; Holland *et al.*, 2009 ; Rummun *et al.*, 2013).

I.1.3 Fruit

Le fruit est la partie comestible du grenadier. De forme arrondie, la grenade mesure 5 à 12 cm de large. La base est couronnée par un calice protubérant (Figure 1-A). Il est relié à l'arbre par une courte tige (Holland *et al.*, 2009 ; Kumari *et al.*, 2012). La pelure de la grenade est

reconnaissable à son péricarpe dur, qui conserve sa couleur orange et verdâtre à maturité pour certaine variété. L'intérieur du fruit est cloisonné en compartiments par des parois membranaires formées de tissus spongieux blancs et astringents. Chaque compartiment est composé de sacs remplis d'arilles légèrement acides, juteux, rouges, roses ou blanchâtres (Kumari *et al.*, 2012 ; Rummun *et al.*, 2013).

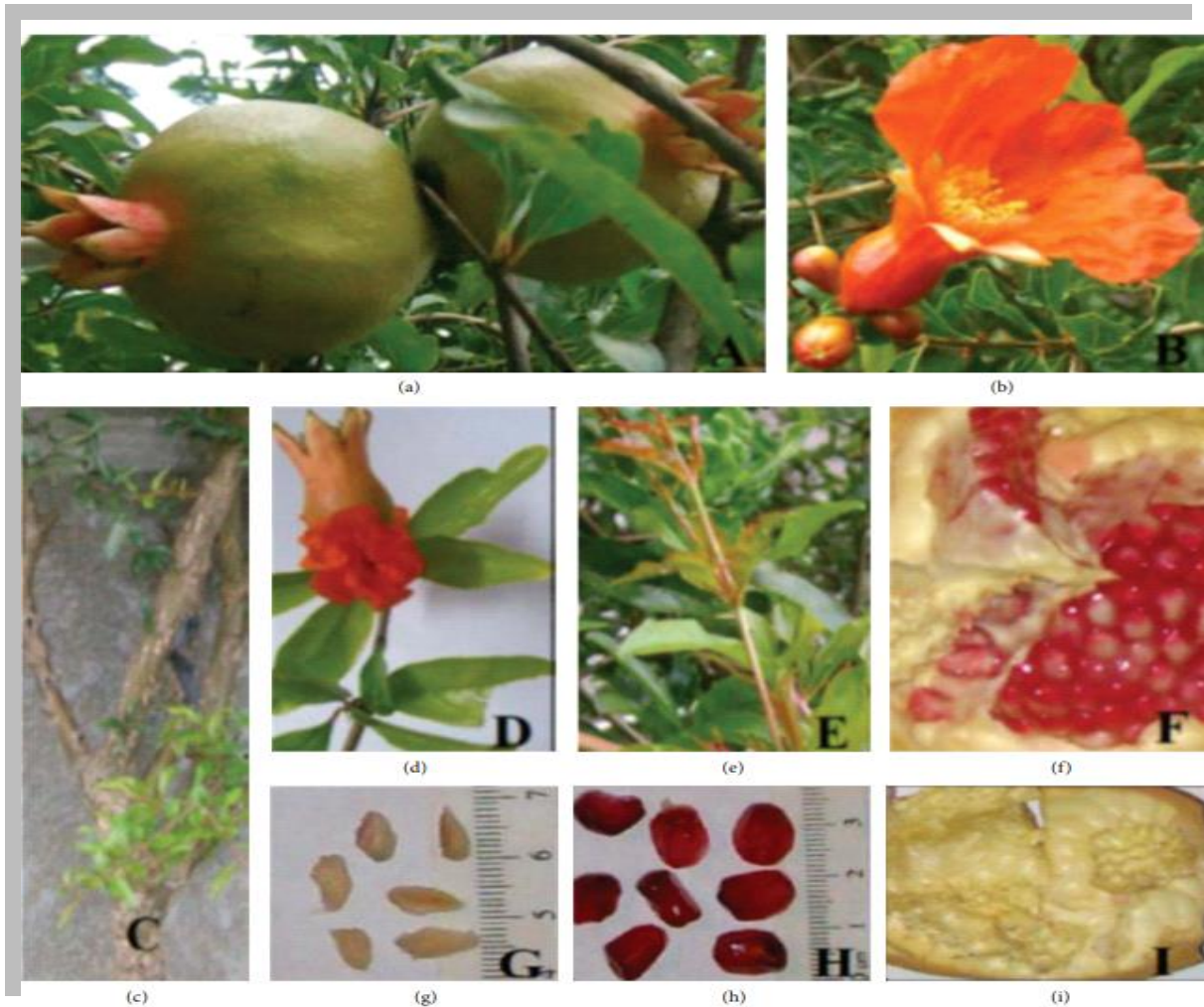


Figure 01 : Différentes parties anatomiques du grenadier (*Punica granatum*). (A) Fruit non mûr ; (B) Fleur ; (C) Tige ; (D) Fleur et calice tubulaire ; (E) Feuilles des extrémités des rameaux ; (F) Ecorce de fruit avec prolongements membranaires formant des compartiments qui contiennent des arilles juteux ; (G) Graines ; (H) Arilles ; (I) Membrane interne de grenade (Rummun *et al.*, 2013).

I.2 Nomenclature et classification botanique

La grenade (*Punica granatum* L., Punicaceae) est un fruit ancien. Son nom est issu du nom latin du fruit « *Malum granatum* », qui signifie « pomme granuleuse ». Le nom générique Punica

fait référence à Pheonicia (Carthage) en raison d'une fausse hypothèse sur son origine (Holland *et al.*, 2009).

- **Classification :**

Règne : plantae.

Division : Mangnoliophyta.

Classe : Mangnoliopsida.

Sous-classe : Rosidae.

Ordre : Myrtales.

Famille : *Punicaceae*.

Genre et Espèce : *Punica granatum L.* (Melgarejo *et al.*, 2020).

I.3 Usage traditionnel et propriétés thérapeutiques

I.3.1 Usage traditionnel

Dans les cultures anciennes, l'homme considérait le grenadier (*Punica granatum*) comme source de remède grâce à ces différents effets bénéfiques pour la santé. Les différentes parties de *Punica granatum*, notamment le fruit, l'écorce, les fleurs et les feuilles ont été recommandés pour soigner diverses affections chez l'homme (Wang *et al.*, 2010). En effet, les fleurs du grenadier ont été utilisées en médecine traditionnelle en décoction et en infusion dans le traitement de la diarrhée et des infections vaginales. De plus, la décoction du fruit est utilisée dans le traitement des hémorroïdes, des parasites intestinaux et des troubles gastro-biliaires (Mohammad et khasani, 2012 ; Askari *et al.*, 2018). L'écorce de *Punica granatum* a été également utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses affections inflammatoires telles que les ulcères, les pharyngites et dans la lutte contre les maladies parasitaires telles que le paludisme (Ge *et al.*, 2021).

Par ailleurs, l'extrait et l'huile des graines et des fleurs de *Punica granatum* ont été traditionnellement utilisés comme agents antihypertenseurs, cardioprotecteurs et anti-hyperlipidémiant (Sobhani *et al.*, 2017). Les feuilles sont utilisées dans la régulation des niveaux de cholestérol. Elles ont également été étudiées pour leur efficacité potentielle dans la

guérison de la néphropathie diabétique, une complication rénale fréquente chez les patients atteints de diabète (Mestry *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2018).

I.3.2 Propriétés thérapeutiques de la grenade

La grenade est reconnue pour ses diverses propriétés biologiques telles que les activités antibactériennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et anticancéreuses (Schubert *et al.*, 1999 ; Alkhatib *et al.*, 2022).

Des études *in vitro* ont prouvé que le fruit de *Punica granatum* présente un effet thérapeutique contre l'infection à *H. pylori*. De plus, une étude récente a montré que l'extrait aqueux issu des écorces de *Punica granatum* a une grande capacité inhibitrice de la réplication du virus responsable de la maladie COVID-19 (Saniee *et al.*, 2009 ; Surucic *et al.*, 2021).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence des effets anticancéreux de la grenade permettant d'inhiber la prolifération des cellules tumorales et d'induire leur apoptose (Otambailu *et al.*, 2019).

Par ailleurs, l'effet hypolipidémiant de la pelure de grenade a été révélé dans une étude réalisée chez le rat, où une réduction significative des rapports TC/HDL-c (diminution du cholestérol total et de l'augmentation du cholestérol HDL) a été observée. Ceci montre l'efficacité de la pelure de grenade dans la diminution des lipides sériques et hépatiques (Middha *et al.*, 2013). Des études précliniques ont montré que la grenade, grâce à sa richesse en antioxydants, est capable de stimuler les cellules bêta de Langerhans à sécréter l'insuline (Goyal *et al.*, 2016).

D'autres travaux ont démontré le rôle bénéfique du fruit de *Punica granatum* dans la diminution du stress oxydant et de la peroxydation lipidique, par le biais de la neutralisation directe des espèces réactive de l'oxygène (ERO) et de la modulation positive des enzymes antioxydantes telles que la Superoxyde dismutase (SOD) et l'inhibition ou l'activation de cratins

facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire κ B (NF κ B) ou le récepteur PPAR, qui régulent respectivement l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et dans le métabolisme lipidique (Eghbali *et al.*, 2021).

De plus, dans une étude clinique menée sur 66 hommes atteints d'oligospermie, l'administration de comprimés contenant un extrait du fruit de *Punica granatum* a démontré une nette amélioration de la mobilité des spermatozoïdes (Fedder *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'application topique de l'extrait de grenade s'est avérée particulièrement efficace pour

contrôler l'inflammation buccale, ainsi que dans la réduction des charges bactériennes et fongiques associées aux affections parodontales et aux stomatites liées à la candidose dentaire (Kumari *et al.*, 2012).

I.4 Composition chimique de *Punica granatum*

Des recherches actuelles ont démontré que le fruit de *Punica granatum* est riche en composés phytochimiques bioactifs qui sont principalement des tanins (acide ellagique), des acides phénoliques (acide caféique), des acides organiques (acide citrique), des flavonoïdes (quercétine) (Sharma et Maity., 2010). (figure 02).

Les principaux groupes de polyphénols identifiés dans la grenade sont les tanins hydrolysables (ellagitanins et esters gallagylglycosides), les acides hydroxycinnamiques et les acides hydroxybenzoïques. Parmi les ellagitanins, le composé prédominant est la punicalagine (2,3-hexahydroxydiphényol-4,6-gallagylglycoside) qui se trouve principalement dans le péricarpe, l'écorce, les fleurs et les graines de la grenade isolée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Wang *et al.*, 2004). Les anthocyanosides constituent un autre groupe de composés bioactifs présents dans la fleur et le fruit de la grenade, et ils sont responsables de la couleur rouge des arilles. Parmi les anthocyanes détectées dans les arilles, les fruits, le jus et les fleurs, Il y a la cyanidine-3-glucoside, la cyanidine-3,5-diglucoside, la cyanidine-3-rutinoside, la cyanidine pentoside, la delphinidine-3,5-diglucoside, la delphinidine-3-glucoside, la pélargonidine-3-glucoside et la pélargonidine-3,5-diglucoside. Ces composés ont été élucidés par des techniques telles que HPLC et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Mohammad et Kashani., 2012 ; Santiago *et al.*, 2014). Les feuilles et la pelure de la grenade renferment des flavonols et des flavones tels que la catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine, le kaempférol, la quercétine et l'apigénine, qui ont été identifiés par des techniques analytiques telles que la RMN et l'infrarouge (IR) (Bagri *et al.*, 2010).

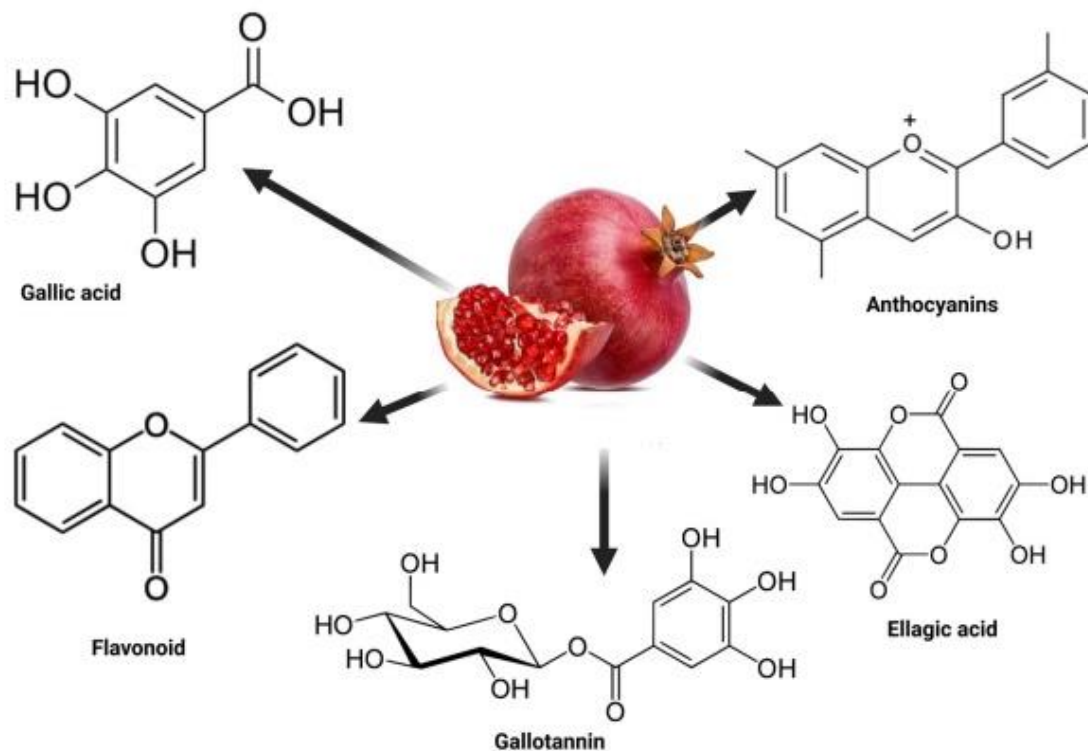


Figure 02 : Les Principaux composés phénoliques de la grenade (Mokgalaboni *et al.*, 2023).

II. Les composés phénoliques

II.1 Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires retrouvés dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Ils forment un ensemble de plus de 8000 molécules, retrouvées en abondance dans les fruits et légumes (Hennebelle *et al.*, 2004 ; Boizot et Charpentier, 2006 ; Luna-Guevara *et al.*, 2018).

Les polyphénols jouent un rôle essentiel dans plusieurs aspects de la biologie végétale. Ils sont impliqués dans l'attraction des pollinisateurs, les fonctions structurelles, la protection contre le rayonnement ultraviolet et la défense contre l'invasion microbienne et celle des herbivores (Harborne *et al.*, 2000 ; Mukherjee *et al.*, 2021). Ils sont particulièrement reconnus pour être des antioxydants naturels, des agents antimicrobiens, anti allergéniques et antiathérogènes (Tanase *et al.*, 2019 ; Felipe *et al.*, 2022).

Les polyphénols sont constitués d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004). Ils sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone *via* la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate. La voie des shikimates conduit après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs dérivés tandis que la voie de l'acétate conduit aux poly-cétoesters ou polyacétates (Chira *et al.*, 2008). Ils sont souvent retrouvés sous forme conjuguée à un ou plusieurs résidus de sucre lié à un groupe hydroxyle (Cutrim et Sloboda, 2018).

II.2 Classification des polyphénols

Les composés phénoliques sont classés en plusieurs sous-classes en fonction des unités phénol présentes dans la molécule, des groupes de substituants et du type de liaison entre les unités phénol. Ces sous-classes comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes, ainsi que les lignanes et stilbenes (Figure 03) (Vuolo *et al.*, 2019 ; Tsimogiannis et Oreopoulou, 2019 ; Rathod *et al.*, 2023).

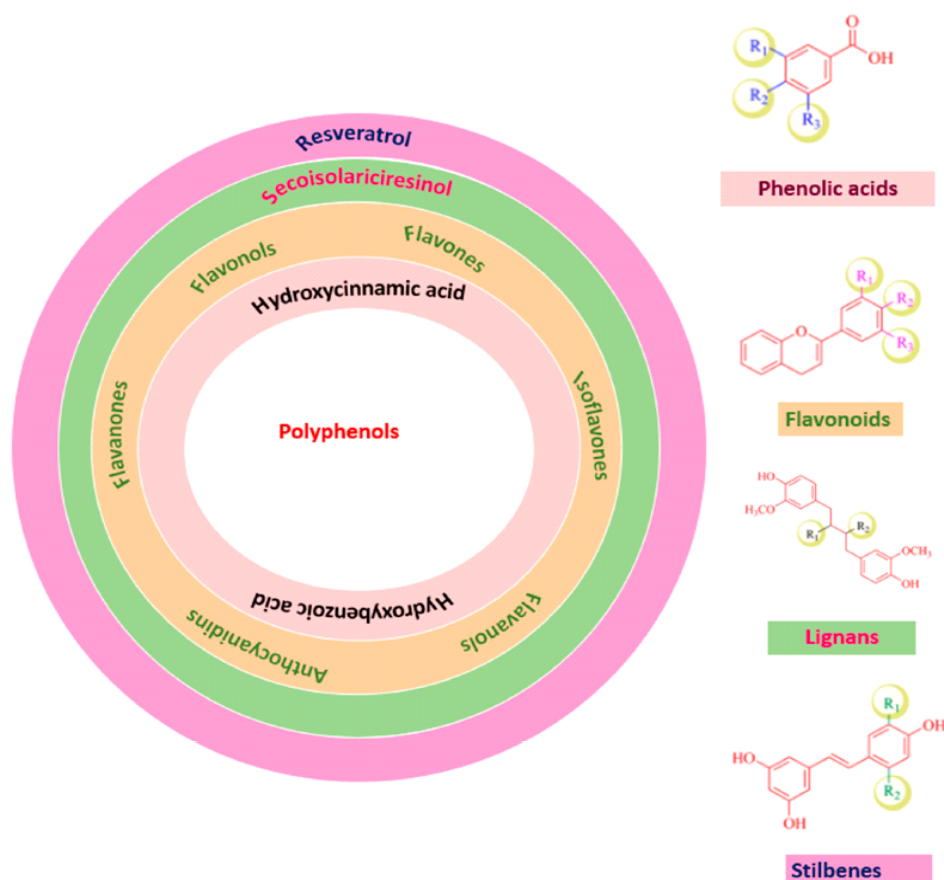


Figure 03 : Classification des polyphénols (Rathod *et al.*

II.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des polyphénols non-flavonoïdes, ils sont retrouvés généralement dans les fruits et légumes et dans les céréales et les graines (Kumar et Goelb, 2019). Les acides phénoliques présentent plusieurs groupes hydroxyles (OH) sur leurs cycles aromatiques (Tsao., 2010). Ils sont subdivisés en deux sous-classes (Figure 4) :

- Dérivés de l'acide hydroxybenzoïques :

Les acides hydroxybenzoïques sont caractérisés par une structure C6-C1 qui comprend un cycle benzénique relié à une chaîne aliphatique par un carbone. Parmi ces acides, sont retrouvés, les acides 4-hydroxybenzoïque, gallique, ellagique et l'acide hexahydroxydiphénique. Ces acides sont retrouvés sous formes conjuguées dans les aliments végétaux, ou à l'état libre dans certains fruits (Tomás-Barberán et Clifford, 2000 ; Chira *et al.*, 2008).

- Dérivés de l'acide hydroxy-cinnamique :

L'acide cinnamique est un composé aromatique en C6-C3 produit à la suite d'une désamination de la phénylalanine catalysée par la phénylalanine ammoniac lyase, suivie d'une hydroxylation pour produire de l'acide paracoumarique (Chira *et al.*, 2008). L'acide cinnamique et l'acide hydroxycinnamique sont également appelés phénylpropanoïdes. Leur structure de base est un cycle benzénique avec une chaîne aliphatique à 3 carbones avec un ou plusieurs groupes hydroxyle souvent estérifiés pour former des esters d'alcools aliphatiques (Teixeira *et al.*, 2013) Les acides hydroxycinnamiques les plus connus sont l'acide caféïque, l'acide p-coumarique, l'acide férulique et l'acide sinapique (Chira *et al.*, 2008). Ces acides sont rencontrés sous forme de condensats avec des alcools, des hydroxyacides ou des mono/disaccharides, ce qui donne lieu à la formation d'esters. Alternativement, ils peuvent également former des amides par condensation avec des amines. Il est rare de les trouver à l'état libre (Tomás-Barberán et Clifford, 2000).

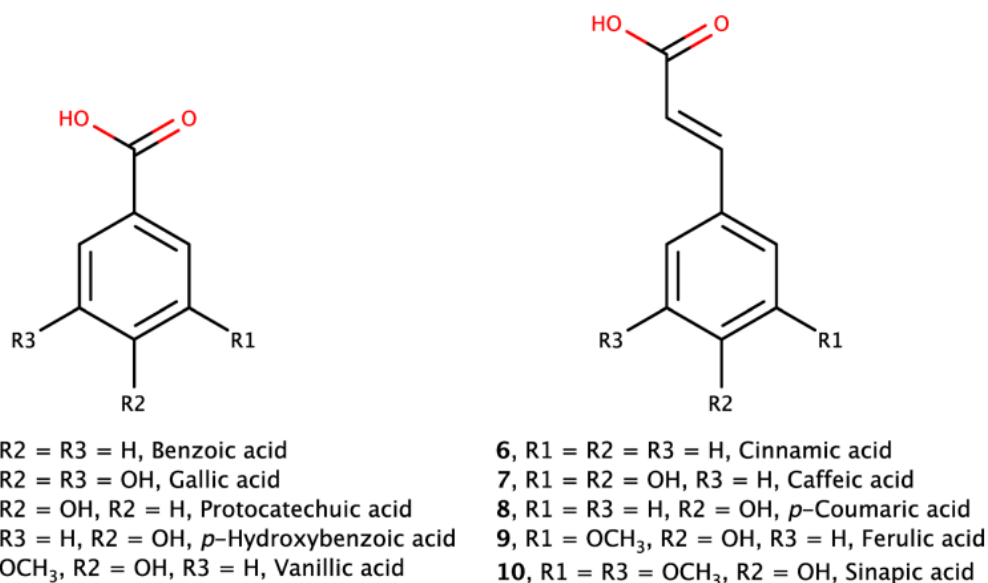


Figure 04 : Structures communes de l'acide benzoïque et acide hydroxycinnamique (Bento- Silva *et al.*, 2020).

II.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules naturelles de structure polyphénolique, principalement retrouvés dans les fruits et légumes. Ils possèdent une structure de base commune en C6-C3-C6, qui correspond à deux cycles benzéniques (cycles A et B) reliés par un pont tri-carboné qui se ferme pour former un hétérocycle oxygéné (cycle C) (Figure 05), (Panche *et al.*, 2016). La biosynthèse des flavonoïdes se fait par la voie des phénylpropanoïdes, et la molécule de départ utilisée est la phénylalanine. Les différentes sous classes des flavonoïdes sont synthétisées à partir d'un squelette flavonoïde de base par l'intervention de diverses enzymes, telles que les réductases, les isomérases, les hydroxylases et plusieurs dioxygénases dépendantes du Fe²⁺/2-oxoglutarate (Martens *et al.*, 2010). (Wink, 2004). Les flavonoïdes sont classés en plusieurs sous-groupes en fonction des différents positions de groupes hydroxy, méthoxy et glycosidiques liés au cycle C (Crozier *et al.*, 2009). Ces sous-groupes sont les anthocyanes, les flavan-3-ols, les flavones, les flavanones et les flavonols (Bravo, 1998 ; Manach *et al.*, 2004 ; Tsao, 2010).

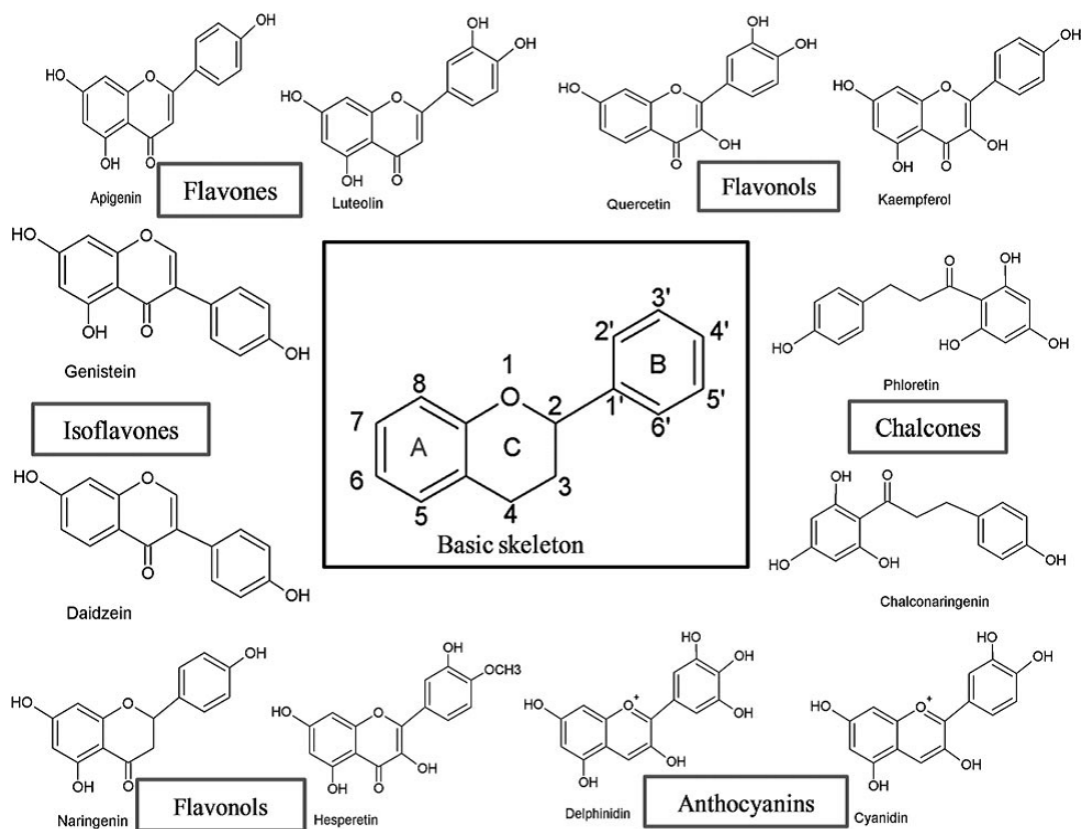


Figure 05 : Structures de base des principales classes de flavonoïdes (Panche *et al.*, 2016).

II.2.3. Les tanins

Les tanins représentent un ensemble hétérogène de polyphénols produits chez les végétaux en réponse à des inducteurs de stress biotiques et abiotiques. Leurs compositions chimiques incluent des cycles phénoliques et des groupements hydroxyles, ce qui leur confère des caractéristiques antioxydantes et une capacité à former des liaisons avec les protéines (Vuolo *et al.*, 2018). Les tanins sont largement répandus dans les tissus de nombreuses espèces végétales, tels que les écorces, les graines et les fruits, ainsi que dans les algues brunes (Smeriglio *et al.*, 2017). Ils sont généralement classés en tanins hydrolysables dérivés de l'acide gallique et en tanins condensés formés à partir des flavanols et des flavanes-3,4-diols (Figure 06), (Ghosh, 2015).

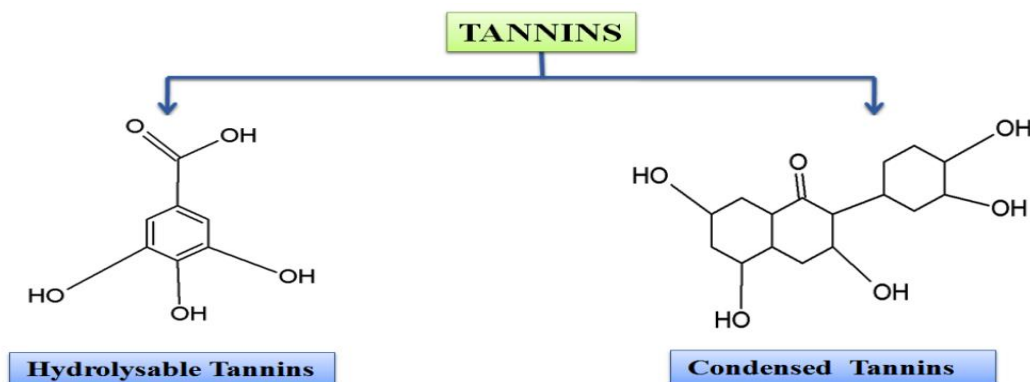


Figure 06 : Types et structure de base des tanins (Ghosh, 2015).

II.2.4. Les stilbènes

Les stilbènes sont des métabolites secondaires non flavonoïdes qui se composent de deux fragments phényle reliés par un pont méthylène 2-C. Ils possèdent deux cycles aromatiques, A et B, et existent sous différentes formes isomères (cis et trans), à la fois libres et glycosylées. Au niveau de la position m, le cycle A est doté de deux groupes hydroxyle, tandis que de nombreuses positions du cycle B sont substituées par des groupes hydroxy et méthoxy (Singla *et al.*, 2019).

II.2.5. Les lignanes

Les lignanes sont des composés non flavonoïdes formés par la liaison de deux unités C6-C3 entre les positions 8 et 8. Les positions C9 et C9 des lignanes sont substituées selon différents schémas, ce qui leur confère des formes structurales distinctes. Ils sont classés en sous-groupes tels que le furane, le dibenzylbutane et l'aryltétraline (Singla *et al.*, 2019). Les lignanes se trouvent principalement sous forme libre dans les légumineuses, les graines et les huiles végétales. Les structures glycosylées sont moins abondantes (Pereira *et al.*, 2009).

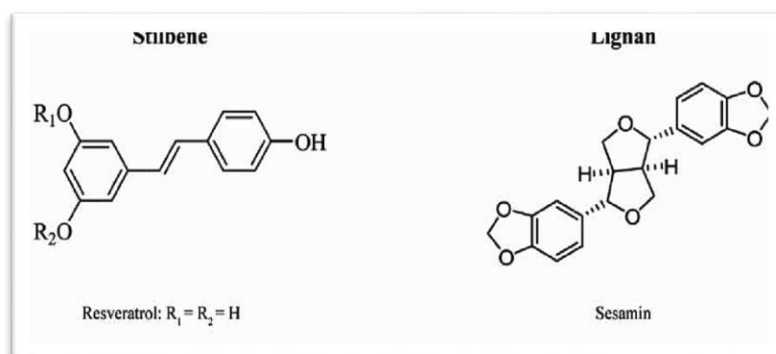


Figure 07 : Structure chimique de stilbènes et de lignanes (Dai et Mumper *et al.*, 2010).

II.3. Propriétés biologiques des polyphénols

II.3.1. Activité antioxydante

À l'état physiologique dans un organisme vivant, la balance redox entre antioxydants et pro-oxydants est maintenue à l'équilibre. Cependant, cet équilibre peut être perturbé soit par une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), soit par une diminution du potentiel antioxydant conduisant ainsi au phénomène du stress oxydant (Migdal et Serres, 2011). Cette perturbation de l'homéostasie redox peut être causée par des agents exogènes pro-oxydants ou d'origine endogène, résultant de la formation de radicaux de l'oxygène au cours du métabolisme cellulaire normal (Migdal et Serres, 2011 ; Birben *et al.*, 2012). Lorsque le stress oxydant survient, il induit l'oxydation non spécifique et irréversible des molécules biologiques telles que les protéines, les lipides et l'ADN. Ce processus entraîne des altérations qui peuvent mener à une dysfonction ou une perte de fonction de ces molécules (Carrière *et al.*, 2006).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron non apparié dans leur couche externe, leur conférant ainsi une grande réactivité. Lorsqu'elles sont produites en excès, ces ERO sont considérées comme des sous-produits. Par conséquent, elles sont impliquées dans le développement de nombreuses pathologies (Alain, 2003 ; Migdal et Serres, 2011).

Les polyphénols sont connus pour exercer leur effet antioxydant par inhibition de la formation des ERO, notamment en ciblant les enzymes impliquées dans leur production, comme la catalase. Ils peuvent également piéger les ERO, grâce au contrôle positif des défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, catalase) et non enzymatiques telles que les vitamines C, E et le bêta-carotène (Birben *et al.*, 2012 ; Mishra *et al.*, 2013).

Les polyphénols ont montré leur capacité à atténuer l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène en réduisant les peroxydases d'hydrogène, ce qui prévient la formation de radicaux hydroxyles (OH[•]) hautement réactifs. Le potentiel redox, également connu sous le nom de potentiel d'oxydoréduction des polyphénols, leur permet de neutraliser les radicaux libres en se liant aux ions métalliques (fer, cuivre), contribuant ainsi à empêcher l'oxydation indésirable (Kumar *et al.*, 2012 ; Mishra *et al.*, 2013).

Les flavonoïdes, en raison de leur structure et du nombre de groupements hydroxyle portés par leurs anneaux aromatiques, agissent comme des agents antioxydants en empêchant l'entrée

des oxydants à la membrane cellulaire par piégeage des radicaux libres. De plus, ils peuvent se distribuer dans la membrane pour inhiber la réaction en chaîne des lipides oxydés grâce à leur pouvoir chélateur des métaux. Ces composés ont la propriété de transformer les hydro peroxydes ou les pro-oxydants métalliques en composés stables (Oteiza *et al.*, 2005 ; Perron *et al.*, 2009).

II.3.2. Activité anti inflammatoire

Les polyphénols ont démontré leur efficacité dans le processus anti-inflammatoire dans plusieurs études. Ils exercent leur action anti-inflammatoire en inhibant des enzymes liées aux propriétés pro-inflammatoires telles que les enzymes cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) ainsi que les lipooxygénases (LOX), bloquant ainsi la biosynthèse des prostaglandines (PG-E), thromboxanes (TX) et leucotriènes (LT), qui sont des médiateurs importants de la réaction inflammatoire aiguë (Santangelo *et al.*, 2007).

Il a été démontré que la rutine est un flavonol qui exerce son action spécifiquement dans les processus inflammatoires chroniques, notamment dans l'arthrite (Rotelli *et al.*, 2003). La curcumine est un autre polyphénol extrait du *Curcuma longa*, capable de réguler l'expression des gènes impliqués dans la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 et l'IL-8. Elle diminue également de manière dose-dépendante l'activité de l'enzyme inductible NO synthase (iNOS) (Jurenka, 2009).

Par ailleurs, les composés phénoliques sont capables d'altérer les systèmes enzymatiques des voies de signalisation du processus inflammatoire, notamment les tyrosine kinases et les sérine-thréonine kinases, directement impliquées dans la prolifération des lymphocytes T et l'activation des lymphocytes B (Campbell et Sefton, 1999).

De multiples études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les composés phénoliques présents dans l'alimentation exercent des effets protecteurs contre l'inflammation en régulant l'activation de NLRP3, un élément central qui relie les cascades de signalisation entre la réponse redox et l'inflammation (Zhang et Tsao, 2016). Les polyphénols exercent leur effet anti-inflammatoire en agissant comme des pièges à radicaux libres, par inhibition de la libération de radicaux libres par les neutrophiles (Nijveldt *et al.*, 2001). De plus, ils régulent les activités cellulaires dans les cellules inflammatoires, par exemple la quercétine, qui possède un puissant effet inhibiteur de la β -glucuronidase et du lysozyme, libérés par les macrophages et les neutrophiles (Hussain *et al.*, 2016).

II.3.3. Activité antimicrobienne, anti fongique et antivirale

Les polyphénols ont démontré une activité antibactérienne contre un large éventail de bactéries (Gram-positives et Gram-négatives), ainsi que des propriétés antifongiques contre des champignons tels que *Aspergillus niger*. Cette activité peut être attribuée à leur capacité de perturber la structure cellulaire et les fonctions métaboliques des microorganismes prélevés directement auprès de patients souffrant d'infections. La majorité des polyphénols qui ont montré un potentiel antimicrobien sur des isolats cliniques sont des flavonoïdes ou des tanins hydrolysables (Manso *et al.*, 2020).

Les polyphénols possédant des propriétés antimicrobiennes provoquent une altération de la perméabilité des cellules microbiennes, ce qui conduit à la dégradation de la composition cellulaire. Le groupement hydroxyle (OH) caractéristique des composés phénoliques joue un rôle crucial dans la mort des cellules bactériennes. Les polyphénols pénètrent dans la cellule bactérienne et inactivent les perméases du periplasme, qui sont impliquées dans le transport des acides aminés et des polysaccharides. Cela entraîne une modification de la perméabilité cellulaire et peut perturber l'échange de protons et réduire le gradient d'ATP à travers la membrane cytoplasmique, conduisant ainsi à la mort des cellules bactériennes (Lojkowska et Holubovsca, 1992 ; Bensid *et al.*, 2022).

La quercétine et l'hespérétine (flavanones) ont démontré leur capacité à inhiber la réplication de certains virus tels que le virus de l'herpès simplex et le virus para influenza (Kaul *et al.*, 1985). Cette efficacité dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques, où un niveau important d'hydroxylation est associé à une toxicité accrue (Sandhar *et al.*, 2011).

La quercétine a également montré son efficacité en réduisant la concentration de l'infectivité du virus para influenza et de l'adénovirus en formant un complexe quercétine-virus. Ce complexe entraîne l'inhibition de l'infection en bloquant l'endocytose par la fixation du virus à la cellule hôte, *via* l'inhibition de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase). De plus, la quercétine est capable de bloquer la transcription du génome viral en inhibant l'ARN polymérase et la traduction des protéines virales (Chaabi, 2020).

III. Méthodes d'extraction non conventionnelle

III.1. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) est un processus d'extraction qui utilise l'énergie des irradiations micro-ondes pour chauffer les solvants en contact avec les particules d'une matrice végétale, facilitant ainsi la migration des composés actifs de la matrice vers le solvant (Eskilsson *et al.*, 2000). Cette méthode implique l'utilisation d'un applicateur à micro-ondes en tant que source d'énergie (Figure 8), ce qui permet une extraction de haute qualité avec une consommation réduite de solvant et de temps, tout en préservant l'intégrité des propriétés physicochimiques de l'extrait (Zheng *et al.*, 2011 ; Huang *et al.*, 2017 ; Keskin *et al.*, 2017).

L'extraction assistée par micro-ondes offre plusieurs avantages par rapport aux techniques conventionnelles telles que l'hydrodistillation et la macération (Tabaraki *et al.*, 2012 ; Kaderides *et al.*, 2015). Selon les résultats de Taghvaei *et al.* (2014), l'efficacité du processus de micro-ondes pour extraire les huiles à partir de graines oléagineuses en utilisant des solvants polaires est attribuée à la destruction des cellules par la dénaturation des groupements protéiques due à la chaleur générée par les mouvements moléculaires. La taille des particules joue un rôle déterminant dans le rendement d'extraction des huiles par solvant assistée par micro-ondes (ESAM). Des particules plus petites facilitent la pénétration des irradiations micro-ondes à travers les parois cellulaires, ce qui entraîne une amélioration des rendements d'extraction. Selon une étude menée par Orak *et al.* (2012), l'extraction par solvant assistée par micro-ondes a montré un rendement d'extraction supérieur à 35 % en seulement 5 minutes, comparé aux rendements de l'extraction par Soxhlet qui était de 34 % pendant 8 heures, et de l'extraction par macération à froid qui était de 17 % pendant 8 heures.

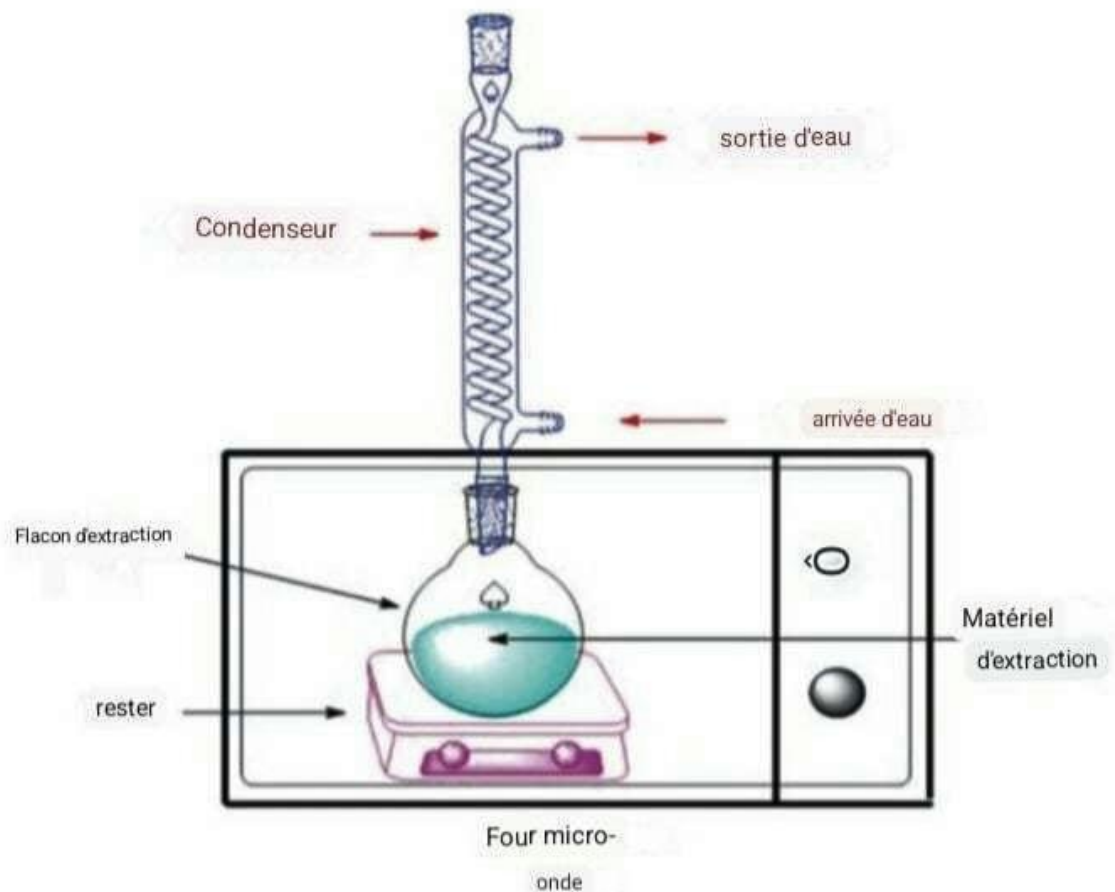


Figure 08 : Représentation graphique de la technique MAE (Alara *et al.*, 2021).

III.2. Extraction assistée par ultrasons (UAE)

La méthode d'extraction assistée par ultrasons (UAE) est une technique d'extraction qui utilise l'effet mécanique résultant de l'implosion de bulles microscopiques pour provoquer une désorganisation rapide des tissus végétaux, facilitant ainsi la diffusion des composés phytochimiques de la matrice dans le solvant (Vinatoru, 2001). Le système d'extraction par ultrasons est composé d'un générateur de puissance, d'un transducteur, d'un amplificateur et d'une sonde. Le transducteur transforme l'énergie électrique en énergie acoustique en vibrant mécaniquement à des fréquences ultrasonores (Figure 9). La matrice biologique est placée dans un récipient d'extraction, le solvant est ajouté, et le processus ultrasonique est initié (Osorio-Tobón *et al.*, 2020).

La méthode d'extraction assistée par ultrasons se distingue par sa rapidité opérationnelle et sa facilité de manipulation. Elle est caractérisée par une faible consommation d'énergie et de solvant (Tabaraki *et al.*, 2012). Cette technique d'extraction utilise deux types d'équipements ;

un bain à ultrasons ou un système à sonde. Le bain à ultrasons est plus simple à manipuler, tandis que le système à sonde est réputé pour sa puissance supérieure grâce à l'accumulation d'énergie ultrasonique (Pingret *et al.*, 2013).

L'extraction des composés bioactifs sous les vibrations ultrasonores (20-100 kHz) est qualifiée de technique « respectueuse de l'environnement » ou « verte » (Khan *et al.*, 2010). C'est une méthode qui est d'un intérêt particulier pour l'extraction d'antioxydants à partir des déchets agricoles et industriels (Balasundram *et al.*, 2006). L'efficacité de l'extraction par ultrasons est due au phénomène de cavitation, qui implique la croissance et l'effondrement de petites bulles microscopiques dans le liquide en mouvement à grande vitesse. Ce phénomène génère des forces mécaniques importantes qui facilitent la diffusion des composés bioactifs et augmentent l'interaction moléculaire entre les composés extraits et le solvant, ainsi que leur solubilité. Par conséquent, la polarité globale du système d'extraction est augmentée (Luque-Garcia et Luque de Castro, 2004 ; Yang *et al.*, 2017).

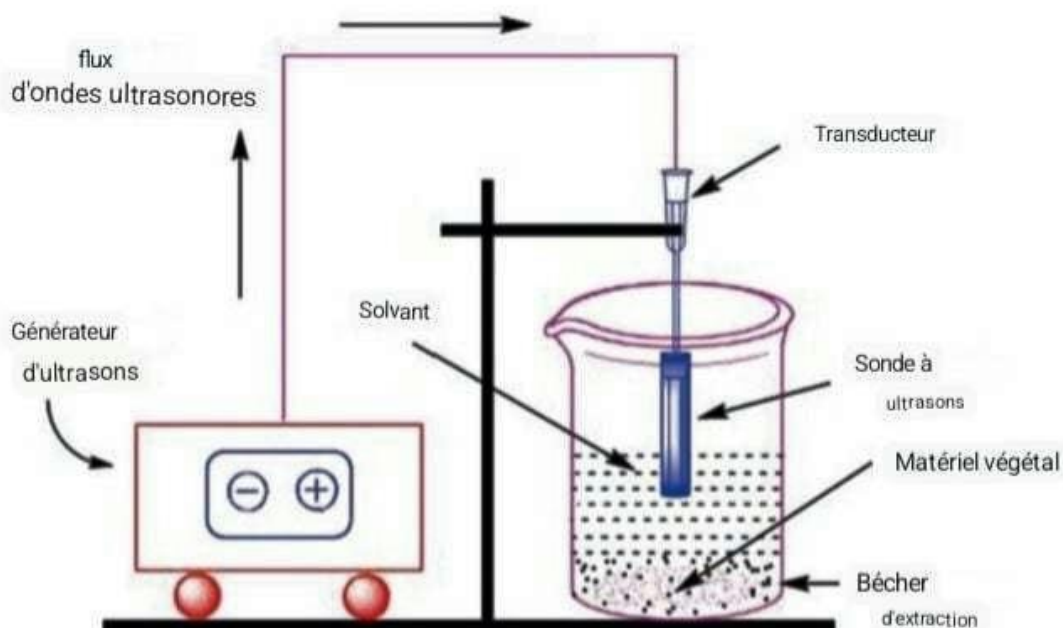


Figure 09 : représentation graphique de la technique UAE (Alara *et al.*, 2021).

III 3. Extraction par fluide super critique

L'unité d'extraction par fluide supercritique est constituée d'une bonbonne à CO₂ comprimé, d'un compresseur, d'un extracteur de 100 ml de volume et de trois bains thermostatiques

(Figure 10). Le CO₂ comprimé est introduit dans l'extracteur par une soupape d'admission. Le débit du solvant est régulé par une valve à micro-aiguille et mesuré à l'aide d'un rotamètre. Le CO₂ sort de la bonbonne à l'état gazeux, à température ambiante et à une pression comprise entre 50 et 60 bars. Ensuite, il est refroidi à une température située entre 3 et 4°C à l'aide d'un échangeur de chaleur cryostatique. Le liquide résultant est introduit dans l'extracteur qui se trouve déjà à la température opératoire, où il se retrouve dans un état supercritique. Une fois que la pression de travail est atteinte et que le temps de contact nécessaire s'est écoulé, la vanne entre l'extracteur et le premier séparateur est ouverte, tandis que les autres vannes sont ajustées pour permettre une circulation adéquate du CO₂ jusqu'à la sortie (Zermane *et al.*, 2010).

La méthode d'extraction assistée par fluide supercritique (SFE) se distingue par sa capacité à extraire différents composants ayant des polarités variées (Luque-Garcia et Luque de Castro, 2004). Le CO₂ supercritique est le solvant le plus couramment utilisé en raison de sa facilité d'obtention et de sa faible température critique, qui correspond à l'état du fluide lorsque sa température et sa pression dépassent les valeurs critiques spécifiques pour ce fluide. Le CO₂ supercritique est utilisé comme solvant pour l'extraction des composés phénoliques à des conditions de température relativement basses (31.1°C) et à une pression modérée (73.8 bars) (Osorio-Tobón, 2020).

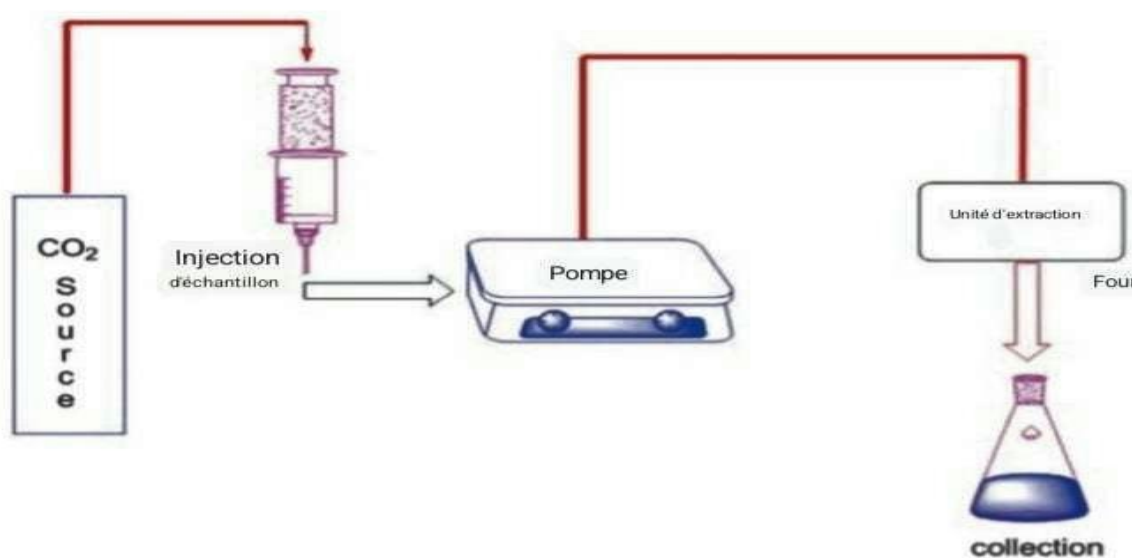


Figure 10 : Représentation graphique de la technique SC-CO₂ (Alara *et al.*, 2021).

Partie II : Partie expérimentale

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

La matrice végétale utilisée dans ce travail est la pelure de grenade. Celle-ci a été récupéré des fruits de la grenadine provenant du commerce dans la ville de Béjaia durant la période octobre-novembre 2022. La pelure de la grenade récoltée a été séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant au moins 3 semaines. Elle a été ensuite broyée à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre obtenue a été tamisée à l'aide d'un tamiseur électrique (<125µm) puis conservée dans des flacons en verre, fermés hermétiquement, étiquetés et stockés dans un endroit sec à l'abri de la lumière, pour une utilisation ultérieure.

II.1.2. Réactifs et appareils

Dans cette étude, nous avons utilisé divers appareils et réactifs spécifiques pour mener à bien l'extraction et l'analyse des composés phénoliques (Tableau I)

Tableau I : Appareils et réactifs utilisés.

| Appareils | Réactifs |
|---|---|
| Broyeur électrique (BRANDMANN). | Ethanol (VWR. PROLABO). |
| Tamiseur électrique (Retch). | Folin-ciocalteu (BIOCHEM CHEMOPHARMA). |
| Etuve (WTC SCIENTIFICA). | Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) (SIGMA – ALDRICH). |
| Vortex (VELP SCIENTIFICA). | Standards (acide gallique, quercétine, catéchine, trolox). |
| Plaque agitatrice (VELP SCIENTIFICA) | Vanilline. |
| Spectrophotomètre (BIOTECH ENGINEERING MANAGMENT) | ABTS (acide 2,2'- azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonique). |
| Balance analytique (ADVENTURER OHAUS) | Persulfate d'ammonium (K ₂ S ₂ O ₈). |
| Ultrasons (SONICS VIBRA CELLE). | DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle). |
| Bain-marie (MEMMERT). | TPTZ (2,4,6-Tris 2-pyridyl)-1,3,4-triazine) |
| Micropipettes. | Acide chlorhydrique (HCL). |
| | Chlorure de fer (III) (FeCl ₃ ,6H ₂ O). |

II.2. Méthodes

II.2.1. Optimisation de l'extraction assistée par ultrasons des polyphénols

Afin de déterminer les paramètres influençant l'extraction des composés phénoliques de la pelure de grenade par ultrasons, une étude préliminaire a été réalisée avant l'optimisation du protocole d'extraction. Une sonde à ultrasons a été utilisée (130W ; 20 kHz). Cette partie de notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de biochimie alimentaire.

L'extraction assistée par ultrasons est souvent influencée par le ratio (soluté/solvant), le pourcentage du solvant d'extraction, l'amplitude des ultrasons et le temps de sonication (Nelly *et al.*, 2017 ; Fazila *et al.*, 2021). A cet effet, nous avons choisi de déterminer d'abord le ratio et le temps à utiliser puis nous avons étudié l'effet des paramètres suivants : pourcentage du solvant, amplitude des ultrasons et temps d'extraction. Un solvant hydro-éthanolique a été utilisé.

II.2.1.1. Détermination du ratio (soluté/solvant)

Le rapport soluté/solvant est l'un des facteurs les plus critiques lors du transfert de masse (Nelly *et al.*, 2017). Afin de déterminer le ratio à utiliser pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques, une extraction a été effectuée en variant le ratio (0.1% ; 0.07% ; 0.05% ; 0.03%). Le pourcentage de solvant éthanolique et l'amplitude de sonication ont été fixés à 50% et le temps d'extraction à 5 min.

II.2.1.2 Détermination de l'intervalle de temps d'extraction

Dans le but de déterminer l'intervalle de temps pour l'extraction assistée par ultrasons des composés phénoliques de la pelure de *Punica granatum*, une série d'expériences a été réalisée en utilisant différents temps d'extraction allant de 5 sec à 5 min. Une autre série d'extractions a été réalisée en variant le temps de 5 à 30 min. Ces expériences ont été menées en utilisant le meilleur rapport soluté/solvant, une concentration éthanolique de 50% (v/v) et une amplitude ultrasonique de 50%.

II.2.1.3. Effet de la concentration du solvant

La solubilité des polyphénols est partiellement influencée par leur polarité, ce qui entraîne des différences significatives dans leur aptitude à se dissoudre dans les solvants. Le choix de la concentration du solvant hydroéthanolique est très important (Galvan *et al.*, 2012). Les composés phénoliques ont été extraits à l'aide de différentes concentrations de solvant

hydroéthanolique (20%, 40%, 60%, 80%) en utilisant le meilleur ratio (soluté/solvant), tandis que le temps d'extraction et l'amplitude ont été fixés à 5 minutes et 50% respectivement. La sélection de la concentration du solvant d'extraction a été basée sur les résultats présentant un contenu le plus élevé en polyphénols totaux (TPC).

II.2.1.4. Effet de l'amplitude de sonication

L'amplitude ultrasonique fait référence à l'intensité des ondes ultrasonores générées par un dispositif ultrasonique. Elle représente l'amplitude maximale des variations de pression créées par les ondes (Nelly *et al.*, 2017). L'extraction des composés phénoliques totaux a été effectuée en faisant varier l'amplitudes comme suit : 20, 40, 60, 80 et 100%, en utilisant la meilleure concentration de solvant déterminée précédemment et un temps d'extraction de 5 minutes. La valeur optimale a été choisie en se basant sur les résultats les plus élevées en composés phénoliques totaux.

II.2.1.5. Effet du temps d'extraction

Les composés phénoliques ont été extraits en utilisant les conditions optimales en termes de pourcentage de solvant et amplitude de sonication prédéterminés. L'extrait a été obtenu en faisant varier le temps d'extraction de 5 secondes à 5 min (5s, 30s puis 1, 2, 3, 4 et 5 min).

II.2.2. Préparation de l'extrait optimisé

Après optimisation et afin de continuer notre analyse, trois extractions ont été réalisées selon les paramètres d'optimisation déterminés. La poudre de la pelure de grenade (<125 µm) a été mise dans des récipients en verre contenant de l'éthanol aux pourcentage et ratio déterminés. Les trois mélanges ont été successivement soumis aux ondes ultrasonores à l'amplitude et au temps déterminés. Ensuite, les extraits ont été filtrés à l'aide de papier Whatman et les filtrats sont congelés (-20°C) pour leur utilisation ultérieure dans les différents dosages et tests de l'activité antioxydantes.

II.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée selon la méthode de (Li *et al.*, 2007). Le réactif utilisé est le Folin-Ciocalteu, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Lorsque les phénols sont oxydés, ce réactif subit une réduction et donne lieu à la formation d'un

mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène, tous deux de couleur bleue (Ribéreau-Gayon., 1968).

Dans chaque tube, un volume de 0,1 ml d'extrait a été mélangé à 0,5 ml du réactif du Folin-Ciocalteu dilué (1:10). Après une période de réaction de 4 minutes, 0,4 ml d'une solution de carbonates de sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 7.5% ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes ont été ensuite agités au vortex puis incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 1h30. L'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à une longueur d'onde de 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. En parallèle, une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant des concentrations croissantes d'acide gallique (0-200 $\mu\text{g/ml}$). Les résultats obtenus ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de poudre (mg EAG/g p).

II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été réalisée en utilisant la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl_3) décrite par Bahorun et al. (1996). Le principe de cette méthode est basé sur la formation de complexes entre le chlorure d'aluminium et les flavones et les flavanols, dans lesquels il réagit avec les groupes céto en position C-4 et les groupes hydroxyles des cycles C, A et/ou B (Lysiuk et Hudz, 2017).

Un volume de 0,5 ml de l'extrait dans chaque tube a été ajouté à un volume égal de chlorure d'aluminium (2%). L'absorbance a été lue à 430 nm après 10 min d'incubation. Pour quantifier la quantité des flavonoïdes, une série de différentes concentrations (0-50 $\mu\text{g/ml}$) de quercétine a été préparée. Le contenu en flavonoïdes est exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par gramme de poudre (mg EqQ/g p).

II.2.2.3. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont quantifiés en utilisant la méthode à la vanilline en milieu acide (Sun *et al.*, 1998). Cette méthode est basée sur la réaction de la vanilline avec les unités constituant les tanins condensés en milieu acide, formant ainsi un complexe coloré dont la densité optique est mesurable à une longueur d'onde de 500 nm.

Un volume de 0.5 ml de vanilline (4% dans l'éthanol) a été mis dans chaque tube contenant 0.2 ml de chaque extrait puis 0.5 ml de HCl a été rajouté. Le mélange est ensuite agité au vortex puis incubé pendant 15 à 20 min à température ambiante. L'absorbance de chaque échantillon est ensuite lue au spectrophotomètre. La teneur en tanins condensés est

déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée à la catéchine (0-50 µg/ml). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme de poudre (mg Cat/gp).

II.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Trois tests différents ont été utilisés pour déterminer l'activité antioxydante des extraits de la pelure de grenade à savoir : l'activité scavenger des radicaux DPPH ABTS et le pouvoir antioxydant réducteur du fer.

II.3.1. Effet scavenger du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•])

La molécule 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour examiner la corrélation entre la structure et l'activité antioxydante des composés phénoliques (Popovic *et al.*, 2009). La capacité peut être évaluée en mesurant la diminution de son absorbance. Ce dosage antioxydant est basé sur la mesure de la décoloration de la solution du DPPH du violet au jaune à 517 nm après réaction avec les composés testés (Bondet *et al.*, 1997).

L'effet « scavenger » du DPPH est déterminé par la méthode décrite par Mokhnache *et al.* (2019), 1ml de la solution de DPPH préparé dans l'éthanol (0.1 mM) a été ajouté à 0.5 ml des extraits obtenus par optimisation. Après 30min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été lue à 517 nm. Le méthanol est utilisé comme blanc et l'acide gallique et la quercétine sont utilisés comme contrôles positifs. Une gamme étalon au trolox a été réalisée (0-0.01 mM) pour l'estimation du potentiel antioxydant de l'extrait optimisé envers le radical du DPPH en Capacité Antioxydante en Trolox Equivalent (TEAC) (mmol TEq. /g poudre). L'activité antioxydante neutralisant de radical libre DPPH[•] a été également exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$AA (\%) = A_0 - A_t / A_0 * 100.$$

Où : AA est l'activité antioxydante inhibitrice de l'oxydation du radical DPPH.

A₀ est l'absorbance de la solution de DPPH[•] en absence de l'extrait.

A_t est l'absorbance du test : solution de DPPH en présence de l'extrait ou du standard.

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

L'évaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait optimisé envers le radical cationique ABTS^{•+} est réalisée selon la méthode décrite par Re et al. (1999). Une solution d'ABTS^{•+} (7 mM) est préalablement préparée avec du persulfate de potassium (K₂S₂O₈) à 2.45 mM dans de l'eau distillée. Ce mélange est laissé sous agitation 16h à obscurité et à température ambiante. Au moment d'utilisation, cette solution est diluée avec du méthanol pour obtenir une absorbance de 0.07± 0,02 à λ = 734 nm.

Le test est réalisé en prenant 20 µl de l'extrait optimisé additionné de 2 ml de la solution diluée de l'ABTS^{•+}, après une incubation pendant 6 min à 30°C, l'absorbance est ensuite mesurée à λ = 734 nm. Une gamme étalon de concentrations croissantes de Trolox (0 - 2 mM) est préparée et testée pour l'activité antioxydante envers le radical de l'ABTS^{•+}. Les valeurs de la capacité antioxydante en Trolox équivalent (TEAC) sont calculées à partir de cette gamme et les résultats sont exprimés en mmol de Trolox équivalent par gramme de poudre (mmol TroloxEq/g p). L'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical ABTS^{•+} en ABTS neutre. L'acide gallique, catéchine et la quercétine sont utilisés comme contrôles positifs. La capacité scavenger du radical cationique ABTS^{•+} est également exprimée en pourcentage (%) selon la formule suivante :

$$AA (\%) = A_0 - A_t / A_0 * 100.$$

Où : AA est l'activité antioxydante inhibitrice de l'oxydation du radical ABTS^{•+}.

A₀ est l'absorbance de la solution de l'ABTS^{•+} en absence de l'extrait.

A_t est l'absorbance du test : solution de l'ABTS^{•+} en présence de l'extrait ou du standard.

II.3.3. Pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer exercé par un extrait est souvent associé à son pouvoir antioxydant. L'essai FRAP dépend de la réduction du complexe ferrique tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) en tripyridyltriazine ferreux (Fe(II)- TPTZ) à pH acide. Le fer ferrique initialement jaune est réduit et devient bleu ou vert. Ce changement de coloration jaune à bleu-vert est proportionnel à l'activité antioxydante de l'extrait et peut être mesuré à 593 nm (Habibou *et al.*, 2019 ; Benzie *et al.*, 1996).

Le réactif FRAP est préparée par le mélange du tampon acétate (300 mM, pH 3.6) à une solution de TPTZ (10 mM de 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-1,3,4-triazine) dissout dans 40 mM de HCl et une solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ aux proportions 10 :1 :1 (v/v/v). Le pouvoir réducteur de l'extrait optimisé obtenu de la pelure de grenade est estimé par l'essai FRAP (Benzie et Strain, 1999). 2 ml du réactif de FRAP fraîchement préparé est ajouté à 65 μl de l'extrait plus 200 μl d'eau distillée. Le mélange est incubé 30 min à température ambiante puis l'absorbance est mesurée à 593 nm contre l'éthanol comme blanc. Les résultats obtenus sont calculés à partir d'une courbe standard 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 des ions ferriques en ions ferreux, sont exprimées en mmol équivalents de Fe^{2+} par gramme de poudre (mmol Eq. $\text{Fe}^{2+}/\text{g p}$). L'acide gallique et la quercétine sont les standards utilisés.

II.4. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de la moyenne \pm écart type. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel Graphpad prism 5 en appliquant l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test de Tuckey, où une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.

Partie III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

Le présent travail est une étude préliminaire pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques totaux à partir de la pelure de grande (*Punica granatum*) par ultrasons. Le pourcentage du solvant, l'amplitude des ultrasons et le temps de sonication sont les paramètres étudiés pour l'optimisation. Le résultat du dosage des polyphénols totaux exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de poudre (mg EAG /g p), est pris en considération pour la détermination de l'effet de chacun des facteurs étudiés pour l'optimisation.

III.1. Optimisation de l'extraction assistée par ultrasons des polyphénols

III.1.1. Détermination du ratio soluté/solvant

Pour déterminer l'effet du rapport solide/liquide sur le contenu en polyphénols totaux obtenus après extraction assistée par ultrasons, quatre différents ratios ont été étudiés (0.1, 0.07, 0.05 et 0.03%). La sonication effectuée pendant 5 min dans l'éthanol à 50% et une amplitude moyenne de 50%. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Contenu en polyphénols totaux selon différents ratios soluté/solvant.

| Ratio (%) | 0.03 | 0.05 | 0.07 | 0.1 |
|-------------------|---------------|----------------|------|-----|
| TPC (mg EAG/g) | 306.12 ± 5.29 | 291.32 ± 18.91 | NA | NA |

NA : non applicable

Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux ont révélé des valeurs similaires à 0.03 et 0.05% (306,12 ± 5,29 mg EAG/g et 291.32 ± 18,91 mg EAG/g, respectivement). Aucune différence significative n'a été enregistrée entre ces deux valeurs ($p > 0.05$). Cependant, la teneur en polyphénols totaux à 0.07 et à 0.1% est indéterminée, où la concentration en polyphénols dans les deux échantillons était trop élevée pour être quantifiée. Ces résultats montrent que le meilleur ratio pour une extraction optimale des composés phénolique est de 0.03% .

Selon Motikara et al. (2020), le meilleur rapport soluté/solvant pour l'extraction assistée par ultrasons des polyphénols totaux à partir de la pelure de grenade est de 1.4%. D'autres études antérieures ont montré des ratios soluté/solvant supérieurs à notre résultat. Des valeurs de 3% et 2.2% ont été retrouvées pour extraire une quantité optimale des polyphénols totaux à partir de la pelure de grenade (Kaderides *et al.*, 2015 ; Moorthy *et al.*, 2015).

La pelure de grenade est reconnue pour être une source très riche en composés phénoliques. La différence observée peut être attribuée à des variations de variétés du fruit, aux différences géographiques, aux conditions agroclimatiques (Mulinacci *et al.*, 2011 ; Dent *et al.*, 2013). D'autres facteurs liés au processus d'extraction sont également cruciaux pour cette différence de contenu en polyphénols totaux. Il s'agit par exemple du séchage, qui représente une étape cruciale visant à réduire l'humidité à des fins de conservation, et qui a aussi une influence directe sur les propriétés physicochimiques des extraits (Sagar et Kumar, 2010 ; Onwude *et al.*, 2016).

III.1.2. Détermination de l'intervalle de temps d'extraction

Afin de déterminer le temps d'extraction assistée par ultrasons des composés phénoliques de la pelure de *Punica granatum*, une série d'extractions a été effectuée à différents temps 5s, 30s, 1min, 2min, 3min, 5min en utilisant le ratio 0.03%, l'éthanol à une concentration de 50% comme solvant d'extraction et une amplitude ultrasonique de 50%. Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Teneurs en polyphénols totaux obtenus à différents temps (30-300s) de sonication.

| Temps (s) | 5 | 30 | 60 | 120 | 180 | 240 | 300 |
|-------------------|---------------------|------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| TPC (mg EAG/g) | 221.91 ± 9.52 | 249 ± 8.67 | 232.54 ± 7.79 | 234.06 ± 10.54 | 248.52 ± 10.99 | 249.72 ± 16.30 | 237.81 ± 3.26 |

Les résultats de l'analyse statistique de contenu en polyphénols totaux de la pelure de grenade varient approximativement de 220 à 250 mg EAG/g. Aucune différence significative n'a été obtenue entre ces différents temps d'extraction ($P > 0.05$).

Une prolongation du temps d'extraction a été effectuée allant de 5min jusqu'à 30min, en utilisant les mêmes conditions d'extraction pour les autres paramètres. Le tableau IV montre les résultats obtenus de l'analyse quantitative des TPC.

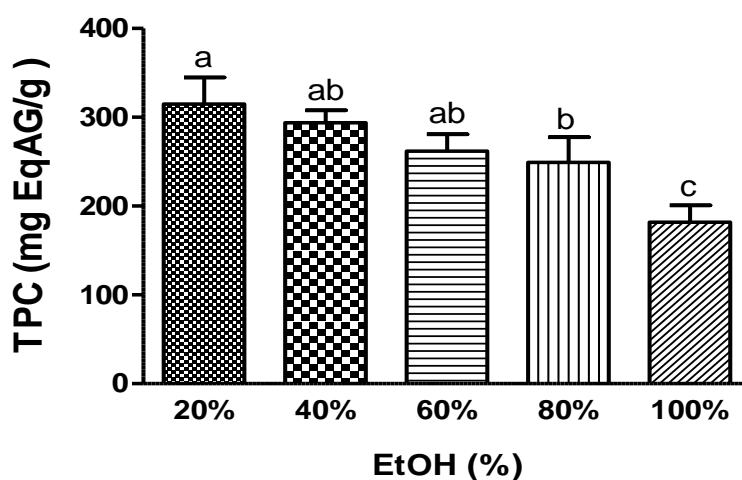
Tableau IV : Teneurs en polyphénols totaux obtenus à différents temps (5-30 min) de sonication.

| Temps (min) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| TPC (mg EAG/g) | 304.79 ± 7.00 | 295.60 ± 4.80 | 270.38 ± 9.56 | 281.28 ± 8.17 | 327.64 ± 30.10 | 277.45 ± 15.80 |

L'analyse statistique des résultats en TPC a révélé une différence non significative ($P>0.05$) entre les différents temps de sonications. Ces résultats montrent que la poudre ($<125\mu\text{m}$) obtenue de la pelure de grenade permet une libération rapide des polyphénols totaux dès les premiers instants de contact avec le solvant d'extraction sous l'effet de la sonication. Ainsi, il n'est pas nécessaire de prolonger le temps d'extraction au-delà de 5 min. Cette durée d'extraction assistée par ultrasons est donc suffisante pour extraire efficacement les polyphénols totaux. Ceci est en accord avec des études antérieures (Hu et He, 2012 ; Ledesma-escobar et Priego-capote *et al.*, 2015 ; Vu *et al.*, 2016).

III.1.3. Effet de la concentration du solvant

Afin de déterminer l'effet de la concentration du solvant d'extraction sur la teneur en polyphénols de la pelure de grenade, quatre concentrations croissantes en éthanol ont été utilisées (20%, 40%, 60% et 80%). L'extraction par ultrasons a été réalisée pendant 5 min en utilisant un ratio de 0.03% et une amplitude de 50 %. Les teneurs en polyphénols totaux



obtenues
sont
illustrées
dans la
figure 11.

Figure 11 : Effet de la concentration du solvant hydroéthanolique sur la teneur en polyphénols totaux extraits de la pelure de grenade.

Le dosage des polyphénols totaux montre que les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux sont obtenues avec l'éthanol 20% (314.79 ± 30.13 mg EAG/g), 40% (293.87 ± 13.82 mg EAG/g) et 60% (261.74 ± 18.99 mg EAG/g). Tandis que des valeurs inférieures ont été obtenues avec les pourcentages 80% et 100% en éthanol (249.23 ± 28.25 mg EAG/g,

181.7±19.25 mg EAG/g) respectivement). Une différence significative a été observée en fonction de la concentration de l'éthanol ($P < 0.05$) (Figure 11).

Une étude de Jingjing et Qipeng (2008) a montré qu'une solution d'éthanol à 20 % est la plus efficace pour l'extraction des polyphénols de la pelure de grenade. Par ailleurs, l'extraction assistée par ultrasons des polyphénols de la pelure de grenade s'est avérée inefficace avec de l'éthanol pur, alors que l'eau pure s'est révélée être le solvant le plus efficace dans ce cas. Cependant, les valeurs optimales des teneurs en composés phénoliques et d'activités anti-oxydantes ont été obtenues lorsque le solvant contenait environ 20 à 25 % d'EtOH (Dimitrov *et al.*, 2019). Dans une autre matrice, les optimales des teneurs en polyphénols totaux extraits des résidus de grains de Brewer, par ultrasons, ont été également obtenus en utilisant un mélange hydro alcoolique contenant 20% d'éthanol (Alonso-Riano *et al.*, 2020).

Nos résultats concordent avec les résultats des recherches précédentes. De plus, des études antérieures ont démontré que l'eau joue un rôle essentiel en tant qu'agent gonflant de la matrice végétale, ce qui augmente considérablement la zone de contact disponible entre la matrice et le solvant. En revanche, l'éthanol provoque la rupture des liaisons entre les solutés et la matrice (Selin Sahin, 2013). Par conséquent, l'eau pourrait créer un milieu plus polaire favorisant ainsi l'extraction des composés phénoliques. Les mélanges contenant de faibles concentrations d'éthanol et d'eau peuvent accéder aux cellules, mais des concentrations élevées d'éthanol pourraient dénaturer les protéines, bloquant ainsi la dissolution des polyphénols et impactant le processus d'extraction (Carciochi *et al.*, 2018).

III.1.4. Effet de l'amplitude des ultrasons

L'effet de l'amplitude des ultrasons sur le contenu des composés phénoliques totaux extraits à partir de la matrice végétale est le deuxième facteur étudié dans ce travail. L'extraction des composés phénoliques totaux de la pelure de grenade a été effectuée en faisant varier l'amplitude de 20, 40, 60, 80 et 100%, en utilisant une concentration du solvant éthanolique à 20% et pendant 5 min. Les résultats du contenu en polyphénols obtenus sont montrés dans la figure 12.

Les résultats obtenus ont montré que la valeur optimale de la teneur en composés phénoliques totaux est obtenue en utilisant une amplitude de 80% avec une valeur de 334.12 ± 2.212 mg EAG/g, tandis qu'une amplitude de 20% a permis l'extraction d'une faible teneur égale à 259.95 ± 2.76 mg EAG/g. L'analyse statistique des contenus en composés phénoliques dans

les extraits de la pelure de grenade a mis en évidence des différences significatives selon l'amplitude ultrasonique appliquée lors du processus d'extraction ($P < 0.05$).

Une extraction optimale assistée par ultrasons en mode pulsé des composés phénoliques de la pelure de *Punica granatum* a été obtenue à une amplitude d'ultrasons de 80% (Kumar et Rao, 2020). Une extraction assistée par ultrasons des polyphénols à partir de déchets de fruits lyophilisés, avec une amplitude de 80% appliquée pendant 4 min, a permis une extraction optimale des composés phénoliques (EstebanLustres *et al.*, 2022). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par des études précédentes car l'amplitude joue un rôle crucial dans l'amplification de l'extraction.

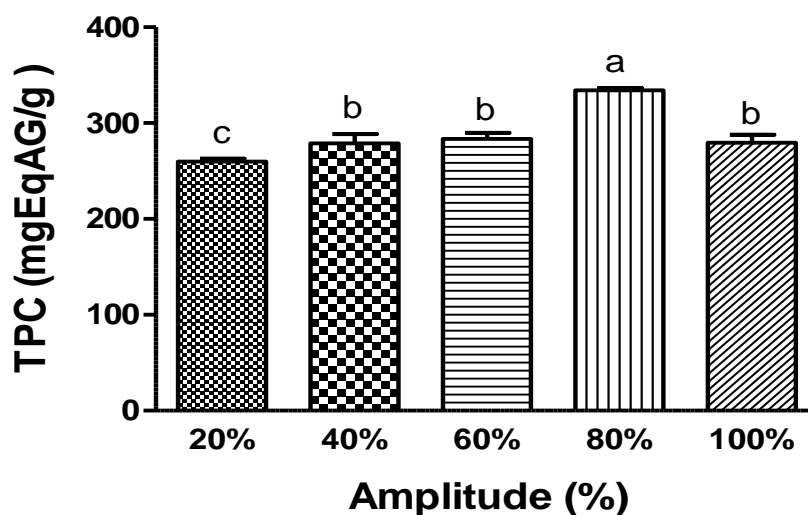


Figure12 : Effet de l'amplitude des ultrasons sur la teneur en polyphénols totaux extraits de la pelure de grenade.

En augmentant l'amplitude, une augmentation du nombre de cycles de compression et de raréfaction des ondes ultrasonores est observée. Ceci entraîne une augmentation de la délivrance des composés extraits (Al-Dhabi *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'extraction assistée par ultrasons des composés phénoliques de la pelure de grenade a révélé qu'un contenu maximal a été atteint en utilisant une faible amplitude ultrasonique de 30% combinée à une température de 50°C (Foujdar *et al.*, 2019). En effet, il a été déjà démontré que des températures plus élevées contribuent à l'augmentation du nombre de bulles de cavitation, du mouvement moléculaire ainsi que de la solubilité des composés d'origine végétale, d'où le fait qu'une amplitude à 30% était suffisante pour une extraction optimale des polyphénols (Hemwimon et Shotipruk, 2007).

III.1.5. Effet du temps d'extraction

Afin de déterminer le temps d'extraction optimale des composés phénoliques totaux par ultrasons, une série d'expériences a été effectuée à différents temps 5s, 30s, 1min, 2min, 3min, 5min, en utilisant un ratio de 0.03%, une concentration éthanolique à 20% et une amplitude de 80%. Les résultats du dosage des polyphénols obtenus sont présentés dans la figure 13.

L'analyse statistique des valeurs obtenues du contenu en polyphénols totaux ne montre aucune différence significative ($p>0.5$) aux différents temps de sonication étudiés. Ainsi, le temps ne semble pas être un facteur influençant l'extraction des composés phénoliques de la pelure de grenade dans les conditions expérimentales de notre étude.

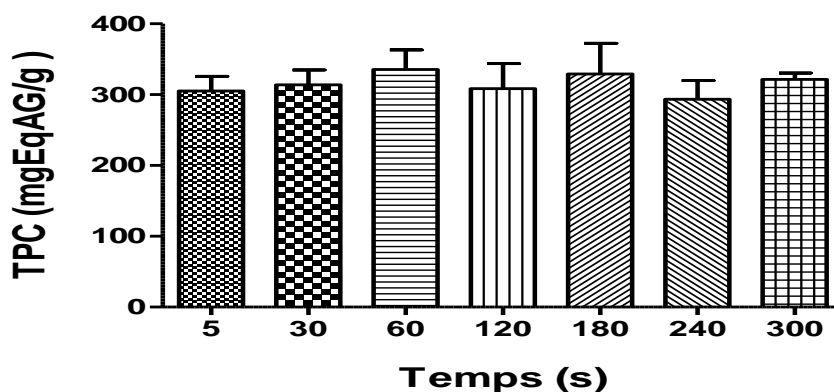


Figure 13 : Effet du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux extraits de la pelure de grenade.

Diverses études antérieures ont démontré l'impact du temps sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir de la pelure de grenade (Kumar *et al.*, 2020 ; Wenxia *et al.*, 2021). Cependant, une étude suggère que l'effet du temps d'extraction n'est statistiquement pas significatif dans leurs études. Ceci pourrait être expliqué par certaines propriétés liées aux ondes ultrasonores, telles que la diminution de la puissance avec le temps due à l'atténuation de l'intensité, ou par la nature de la matrice riche en composés phénoliques, entraînant une libération rapide des polyphénols totaux dès le début du contact avec le solvant d'extraction (Izadyan et Hemmateenejad, 2016).

III.2. Contenu en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés contenues dans l'extrait optimisé de la pelure de grenade, ont été évaluées en utilisant des méthodes colorimétriques. L'extraction assistée par ultrasons en mettant en œuvre les conditions optimales spécifiques dont la concentration de solvant à 20%, l'amplitude ultrasonique à 80% et une durée d'extraction de 5 minutes.

Les contenus en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés de l'extrait de la pelure de *Punica granatum* ont été estimés à partir des trois droites standards (annexe 01).

Le tableau suivant présente les valeurs obtenues des différents dosages réalisés sur l'extrait optimisé de la pelure de grenade.

Tableau V : Contenus en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tanins condensés.

| Concentration EtOH (%) | Amplitude (%) | Temps (min) | TPC (mg EAG/g p) | TFC (mg EQ/g p) | Tanins (mg EC/g p) |
|------------------------|---------------|-------------|------------------|-----------------|--------------------|
| 20 | 80 | 5 | 345.42 ± 4 | 11.31 ± 0.81 | 28.31 ± 0.71 |

III.2.1. Teneurs en polyphénols totaux

L'extraction optimisée des polyphénols totaux à partir de la pelure de *Punica granatum* a permis d'obtenir une valeur de 345.42 ± 4 mg EAG/g p. Une valeur inférieure (276 mg EAG/g) a été observée dans une étude où l'extraction a été réalisée dans un bain à ultrasons (Živkovic *et al.*, 2018). Cette différence peut être expliquée par l'utilisation de l'ultrason à sonde, un système permettant d'amplifier et de concentrer l'énergie des ultrasons, améliorant ainsi l'efficacité de la sonication par rapport aux systèmes de bain.

Des teneurs en polyphénols proches à notre résultat ont été également retrouvées dans d'autres études, où des contenus de 354.67 et 324.9 mg EAG/g ont été obtenus (Amyrgialaki *et al.*, 2014 ; Foujdar *et al.*, 2019). (Mabrouk *et al.*, 2019). Par ailleurs, des résultats similaires (342 mg EAG/g de poudre) sont obtenus par macération dans l'éthanol pendant une durée de 24 heures (Carrera *et al.*, 2012). Ainsi, il apparaît qu'une extraction assistée par ultrasons permet de réduire le temps d'extraction jusqu'à 10 fois par rapport à la macération.

III.2.2. Teneurs en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a révélé une quantité de 11.31 ± 0.81 mg EQ/g p. Ce résultat concorde les résultats de travaux antérieurs qui ont montré des teneurs proches en flavonoïdes (10 et 12.27 mg QE/g), (Jaisinghani *et al.*, 2018 ; Motikar *et al.*, 2020). Au contraire, Sood et Gupta (2015) ont obtenu une valeur supérieure estimée à 16.40 mg QE/g en utilisant l'éthanol à 60% pour extraire les composés phénoliques de la pelure de grenade. Cette différence serait due à l'augmentation de la concentration d'éthanol. En effet, il a été rapporté que l'extraction des flavonoïdes totaux à partir de la pelure de *Punica granatum* été plus efficace a une concentration d'éthanol plus élevée (Karacabey et Mazza, 2010 ; Elfalleh *et al.*, 2016).

III.2.3. Teneur en tanins condensés

L'analyse quantitative de la teneur en tanins condensés a révélé une valeur de 28.31 ± 0.71 mg EC/g p. Une quantité similaire (26.10 ± 0.58 mg EqC/g) a été retrouvée dans l'extrait de la pelure de grenade obtenu par extraction assistée par ultrasons en utilisant du solvant hydrométhanolique (70%) et une amplitude de 80% pendant 12,5 min (Kumar *et al.*, 2020). L'amplitude de sonication améliore l'extraction des tanins en réduisant la tension superficielle et la viscosité, facilitant ainsi l'effet de la sonication (Kadam *et al.*, 2015).

Des teneurs équivalentes ont été retrouvées dans d'autres matrices végétales telles que le pépin de raisin ; dans lequel une quantité de 24.2 mg EqC/g de poudre dans du méthanol à 25% (Bosso *et al.*, 2016). L'efficacité des mélanges hydroalcooliques dans l'extraction des composés phénoliques est probablement due au fait qu'ils soient le plus adaptés en raison des différentes polarités des composés phénoliques (Muñiz-márquez *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'utilisation de pourcentages élevés en alcools (80%) pourrait provoquer une dénaturation des polyphénols par hydratation et effondrement des cellules végétales (Carciochi *et al.*, 2018).

III.3. Activité antioxydante

L'analyse des activités antioxydantes *in vitro* de l'extrait de pelure de grenade obtenu par la méthode d'extraction assistée par ultrasons à sonde, a été effectuée grâce aux tests de neutralisation des radicaux libres DPPH[•] et ABTS^{•+} ainsi que le pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP).

L'analyse de l'effet neutralisant de l'extrait de pelure de grenade et des standards (acide gallique, quercétine) sur les radicaux libres DPPH• et ABTS^{•+} ainsi que son pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP) est exprimé dans le tableau VI.

Tableau VI : résultats de test anti radicalaire DPPH, ABTS et pouvoir réducteur de fer (FRAP).

| Activité anti-radicalaire | DDPH[•] (mmol Eq Trolox/g) | ABTS^{•+} (mmol Eq Trolox /g) | FRAP (mmol Eq Fe ²⁺ /g) |
|----------------------------------|---|---|---|
| Extrait optimisé | 0.27 ± 0.005 | 3.347±0.285 | 6.25 ± 0.21 |
| Acide gallique | 16.40 ± 0.09 | 130.51 ± 1.91 | 22.38 ± 6.23 |
| Quercétine | 2.97 ± 0.12 | 110.68 ± 19.60 | 20.91 ± 2.91 |
| Catéchine | 4.62 ± 0.14 | 161.21 ± 19.24 | / |

III.3.1. Activité antiradicalaire envers DPPH• et ABTS^{•+}

Les résultats obtenus (Tableau VI) indiquent que l'extrait de pelure de grenade présente une activité antioxydante, mesurée en termes d'inhibition de l'oxydation des radicaux libres DPPH• et ABTS^{•+}. Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du DPPH• est de 83.31 ± 0.86% et 29.85 ± 1.6 pour l'ABTS^{•+}. Par ailleurs, en TEAC, les valeurs obtenues sont de 0.27 ± 0.0005 mmol Eq Trolox/g pour le DPPH est de 3.347 ± 0.28 mmol Eq Trolox/g pour l'ABTS.

Les résultats correspondant aux standards ont également montré une capacité antioxydante en trolox équivalente nettement plus importante envers le radical ABTS par rapport au radical DPPH (Tableau 6). L'acide gallique a montré le meilleur potentiel neutralisant du DPPH (16.4 ± 0.09 mmol Eq Trolox/g) par rapport aux deux autres standards. Tandis que la cathéchine a eu l'effet antioxydant le plus élevé envers l'ABTS (161.24 ± 19.24 mmol E Trolox/g).

Ces résultats peuvent être expliqués par le pouvoir antioxydant des composés phénoliques contenus dans l'extraits de la pelure de grenade, qui est lié à leur capacité réductrice en tant qu'agents donneurs d'hydrogène ou d'électrons (Balasundram *et al.*, 2006). Des études antérieures ont également montré des activités anti-radicalaires similaires à nos résultats pour la pelure de grenade (Sharayei *et al.*, 2017 ; Magangana *et al.*, 2020). Cependant, une autre étude a rapporté une activité antioxydante plus faible (Peršurić *et al.*, 2020). Ces différences

peuvent être expliquées de la différence des teneurs en composés phénoliques mais aussi de leurs structures (Kumar et Rao, 2020). Une étude menée par Yu et al. (2021) a montré que l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Punica granatum* présentait une capacité de neutralisation de l'ABTS, qui est proche à notre résultat (2.14 mmol Eq Trolox/g).

La capacité antioxydante est liée à la présence de molécules bioactives à potentiel antioxydant dans les tissus des végétaux supérieurs. En effet, les plantes sont capables de développer des mécanismes de défense naturels, tels que l'accumulation de composés phénoliques, ce qui entraîne une amélioration de leur capacité antioxydante (Elfalleh *et al.*, 2009).

III.3.2. Pouvoir antioxydant réducteur du fer

Le pouvoir réducteur de fer exercé par l'extrait optimisé de la pelure de grenade est de 6.25 ± 0.28 mmol Eq Fe^{2+} /g de poudre, tandis que les valeurs pour les standards acides gallique et quercétine sont de l'ordre de 20 mmol Eq Fe^{2+} /g (Tableau VI).

Ces résultats sont corrélés à la capacité des composés phénoliques de former des complexes de chélation avec les métaux, en particulier le fer et le cuivre. Cette propriété permet d'inhiber la catalyse de la formation des radicaux libres par ces métaux (Balasundram *et al.*, 2006).

Les études de Shams Ardekani et al. (2011) ont montré des valeurs similaires pour les extraits hydroalcooliques de la pelure de grenade provenant de différentes variétés. Cependant, des valeurs nettement inférieures ont été obtenues pour l'extrait de la fleur de grenade (Wu *et al.*, 2021). Cette différence significative pourrait être attribuée à la variation de compositions et de structures entre les différentes parties de la plante (Sánchez-Marzo *et al.*, 2019). En effet, la structure des composés phénoliques joue un rôle crucial dans leur capacité à piéger les radicaux libres et à chélater les métaux. Le nombre et la position des groupes hydroxyle par rapport à la fonction carboxyle sont des facteurs qui influencent l'activité antioxydante des composés phénoliques (Balasundram *et al.*, 2006).

IV. Conclusion et perspectives

Notre étude a été consacrée à l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques de la pelure de grenade (*Punica granatum*) par sonde à ultrasons, une méthode d'extraction non conventionnelle. L'objectif de ce travail était de valoriser un sous-produit naturel en utilisant un protocole d'extraction le plus simple et le plus rentable.

L'optimisation des conditions d'extraction est essentielle pour augmenter la teneur en composés phénoliques extraits de la pelure de grenade. Afin de déterminer l'optimum des conditions d'extraction, l'effet de trois variables indépendantes, à savoir la concentration du solvant (%), l'amplitude des ultrasons (%) et le temps d'extraction (min) ont été étudiés. Les meilleures conditions d'extraction assistée par ultrasons pour les polyphénols totaux à partir de la pelure de grenade obtenues sont l'éthanol à 20% sous une amplitude de 80% et pendant 5 minutes. La concentration du solvant et l'amplitude ultrasonique ont montré des effets significatifs ($P < 0.05$) sur l'extraction de ces composés, tandis que le temps de sonication est apparu comme un facteur sans effet.

L'analyse du contenu en composés phénoliques de l'extrait de *Punica granatum* optimisé a permis d'obtenir des valeurs de TPC (345.42 ± 4 mg EAG/g p), TFC (11.31 ± 0.81 mg EQ/g p) et de tanins condensés (28.31 ± 0.71 mg EC/g p). Cet extrait a montré une activité antiradicalaire envers le DPPH (0.27 ± 0.005 mmol Eq trolox/g de poudre), l'ABTS (3.34 ± 0.28 mmol Eq trolox/g de poudre), et un bon pouvoir réducteur de fer (6.25 ± 0.21 mmol Eq Fe^{2+} /g de poudre).

Cette étude a permis de mettre en évidence que la pelure de *Punica granatum* est une source potentielle de polyphénols, reconnus pour leurs propriétés antioxydantes. La technique d'extraction assistée par ultrasons est une méthode simple, rapide et efficace ne nécessitant pas de grands moyens.

Dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant :

- D'étudier l'effet d'autres paramètres tels que la température et le pH.
- D'utiliser d'autres techniques non conventionnelles telles que l'extraction par micro-ondes, pour comparer.
- D'utiliser des modèles mathématiques tels que les plans d'expériences pour l'optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques.
- De réaliser une analyse phytochimique par HPLC permettant d'identifier la nature des composés phénoliques obtenus par optimisation.

Conclusion et perspectives

Etudier des tests d'activité anti oxydants tels que Test CUPRAC, Test PFRAP, et activité biologiques comme activité anti fongique, anti bacterienne, anti cancéreux.

Références bibliographiques

- Abbasi H, Rezaei K, Rashidi L. Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO₂. *Journal American Oil Chemists Society* 2008 ;85: 9-83.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S et al., "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases". *The Journal of Biological Chemistry* 1987 ;262 : 5592-5595.
- Alaine F. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanisme biochimique* 2003 :108-115.
- Alara OR, Abdurahman NH, Chinonso Ishamel Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science* 2021 ;4 : 200-214.
- Al-Dhabi NA, Ponmurugan K, Maran Jeganathan P. Développement et validation de l'extraction assistée par ultrasons de composés phénoliques à partir de déchets de café. *Ultrasonics Sonochemistry* 2017;34 : 206-213.
- Alkhatib M, Fayad C, Badran A, Hamade K, Daou A, Baydoun E, Hijazi A. Préventive and Therapeutic Effects of *Punica granatum* (Pomegranate) in Respiratory and Digestive Diseases. *Applied Sciences* 2022 ; 12(23) :1-19.
- Alonso-Riaño P, María Teresa Sanz Diez MT, Blanco B, Beltrán S, Trigueros E, Benito-Román O. Water Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenol Compounds from Brewer's Spent Grain Kinetic Study. Extract Characterization, and Concentration Antioxidants 2020; 9 : 265
- Amyrgialaki E, Makris DP, Andy Mauromoustakos C, Panagiotis Kefalas A. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 2014 ;59 :216–222.
- Ara KM, Raofie F. Application of Response Surface Methodology for Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil pomegranate peel (*Punica granatum* L.). *Journal Food Sciences Technology* 2016; 53 :3113–3121.
- Archana K, Jyotsna D, Anil K, Ashok K. Pomegranate (*Punica granatum*). *International journal of pharmaceutical and chemical sciences* 2012 ;1(4) :1218-1222.
- Askari SF, Mohagheghzadeh A, Azadi A, Jahromi BN, Tansaz M, Badr P, "A brief review on vaginal drug delivery in traditional Persian medicine. *Traditional and Integrative Medicine* 2018 ; 3 : 223–229.
- Audrey Carrière, Anne Galinier, Yvette Fernandez, Maria-Carmen Carmona, Luc Pénicaud et Louis Casteilla. Les espèces actives de l'oxygène le yin et le yang de la mitochondrie. *Médecin Science (Paris)* 2006 ;22 : 47-53.
- Bagri P, Ali M, Sultana S, Aeri V. New flavonoids from *Punica granatum* flowers. *Chemistry of Natural Compounds* 2010 ;46 : 201–204.
- 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.
- Balwinder S, Jatinder PS, Amritpal K, Narpinder S. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel, Pre-proofs 2020 : 6-10.
- Belkacem N, Djaziri R, Lahfa F, El-Haci IA, Boucherit Z. Phytochemical Screening and In Vitro Antioxidant Activity of Various *Punica granatum* L. Peel Extracts from Algeria: A Comparative Study. *Phytothérapie* 2014 ;12 :372-379.

Références bibliographiques

- Bensid A, El Abed N, Houicher A, Regenstein JM, Özogul F. Antioxidant and Antimicrobial Preservatives: Properties, Mechanism of Action and Applications in Food—a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2022 ;62(11) : 2985-3001.
- Bento- Silva A, Koistinen VM, Mena P, Bronze MR, Hanhineva K, Sahlstrøm S, Kitrytė V, Moco S, Aura AM. Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids : do we understand individual variability?. *European Journal of Nutrition* 2020 ,59:1275–1293.
- Benzie I-F-F, Strain J-J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) a measure of antioxidant power : The frap assay. *Analytical Biochemistry* 1996, 239 :6- 70.
- Benzie I-F-F, Strain J-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 Enzymology* 1999, 299 : 15-27.
- Bidri M, Choay P. Regain d'intérêt pour la grenade, un fruit majestueux aux multiples propriétés. *Phytothérapie* 2016 :1-13.
- Birben E, Sahiner U-M, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense . *WAO Journal* 2012 ,5 : 9–19.
- Boizot N, Charpentier J-P. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques 2006, 4 : 79-82.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using the DPPH Free Radical Method. *LWT-Food Science and Technology* 1997;30: 609-615.
- Bosso A, Guaita M, Petrozziello M, Influence of solvents on the composition of Condensed tannins in rape pomace seed extracts. *Food Chemistry* 2016; 207: 162-169.
- Bravo L, Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 1998 ; 56 : 317–333.
- Burapadaja S, Bunchoo A. Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Medica* 1995 ; 61:365.
- Campbell M-A, Sefton C-M, “Protein tyrosine phosphorylation is induced in murine B lymphocytes in response to stimulation with anti-immunoglobulin. *European Molecular Biology Organization* 1999; 9 : 2125–2131.
- Carciochi R-A, Sologubik C-A, Fernández M-B, Manrique G-D, D'Alessandro L-G. Extraction of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grain : Optimization and kinetics modeling. *Antioxidants* 2018 ; 7 : 45.
- Carrera C, Ruiz-Rodriguez A, Palma M, Barroso C-G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compound from grapes. *Analytical chemical acta* 2012 ; 732 : 100-104.
- Carrière A, Anne Galinier A, Fernandez Y, Carmona M-C, Pénicaud L , Casteilla L. Les espèces actives de l'oxygène : le *yin* et le *yang* de la mitochondrie. *Medecin science* 2006;22 :47-53.
- Chaabi M. Effets antiviraux de la quercétine et des composés apparentés. *Naturopathic Currents* 2020 :1-5.
- Chemat F, Lucchesi M E. extractions assistées par micro-ondes des huiles essentielles et des extraits aromatiques. *Journal Sociale. Ouest-Africa. Chemistry* 2005; 020 :77-99.
- Chira K, Suh J-H, Saucier C, Teissèdre P-L. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* 2008 ; 6 : 75-82.

- Crozier A, Jagnath I-B, Clifford M-N. Dietary phenolics ; Chemistry, bioavailability and effects on health 2009; 26 : 1001-1043.
- Cutrim C-S, Sloboda Cortez M-A. A review on polyphenols: classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology* 2018; 71: 15.
- Dai J, Mumper R-J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 2010 ;15 :7313-7352.
- Dent M, Dragovic-Uzelac V, Penic M, Bosiljkov T, Levaj B. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.). *Extracts, Food Technology and Biotechnology* 2013 ;51(1): 84–91.
- Dimitrov K, Pradal D, Vauchel P, Baouche B, Nikov I, Dhulster P. Modeling and Optimization of Extraction and Energy Consumption during Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Pomegranate Peels. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 2019: 1-7.
- Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crop Products* 2015 ;75 :9-141.
- Eghbali S, Askari S-F, Avan R, Sahebkar A. Therapeutic Effects of *Punica granatum* (pomegranate) :An Updated Review of Clinical Trials. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2021 : 22.
- Elfalleh W, Nasri N, Marzougui N, Thabti I, M'rabet A, Yahya Y, Lachiheb B, Guasmi F, Ferchichi A. Physico-chemical properties and DPPH-ABTS scavenging activity of some local pomegranate (*Punica granatum*) ecotypes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2009; 60(2):197-210
- Eskilsson C-S, Bjorklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Chromatography A* 2000 ;902 :227–250.
- Esteban-Lustres R, Sanz V, Domínguez H , Dolores Torres M. Ultrasound-Assisted Extraction of High-Value Fractions from Fruit. *Industrial Processing Waste Foods* 2022 ; 11 : 1-13.
- Fazila Z, Jen-Kit T, Siti Munirah M-F, Mohd Basyaruddin A, Siti EA. Ultrasound-assisted extraction conditions optimisation using response surface methodology from *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil leaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 2021; 81:105-851.
- Fedder M-D, Jakobsen H-B, Giversen I, Christensen L-P, Parner E-T, Fedder J. An Extract of Pomegranate Fruit and Galangal Rhizome Increases the Numbers of Motile Sperm: A Prospective, Randomised, Controlled, Double-Blinded Trial. *Pomegranate and Galangal Increase Sperm Motility* 2014 ;9 : 1-9.
- Felipe Osorio-Tobón J. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Association of Food Scientists & Technologists* 2020 ;57 :4299-4315.
- Foujdar R , Bandhu Bera M , Kumar Chopra H. Optimization of process variables of probe ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from the peel of *Punica granatum* Var. Bhagwa and its chemical and bioactivity characterization. *Journal of food processing and preservation* 2019 :1-16.
- Galvan D, Kriaa L, Nikov K, Dimitrov IK. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Purification Technologie* 2012 ; 93 : 42–47.
- Ge S, Duo L, Wang J, Zhula G, Yang J, Li Z, Tua Y. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of Ethnopharmacology* 2021 ; 271 : p14.

- Ghedira k. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Pharmacognosie* 2005; 4: 162-169.
- Ghosh D. Tannins from Foods to Combat Diseases. *International Journal of Pharma Research & Review* 2015 ; 4(5) :40-44.
- Ghoshal G. Vegetable and Fruit Wastes. Utilization in Novel Industrial Applications 2022 : 207-235.
- Goyal R, Thawani J, nagtilak S, Pathania M, jindal S. antioxidative effect of punica granatum (pomegranate) on biochemical parameters in patients with diabetes mellitus (type 2) and myocardial infarction: a double blind placebo controlled trial. *International Journal of Advanced Research* 2016 ; 4(5) :857–864.
- Habibou M-M, Idrissa M, Ikhiri Khalid M-C, Benjamin O, Rabani A . Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr. *European Scientific Journal* 2019 ;15: 1857 – 7881 .
- Haghi A, Azimi H, et Rahimi R. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of three phytochemicals , curcumin, quercetin, and allicin, in the treatment of gastric cancer. *Journal of gastrointestinal cancer* 2017 ;48(4) : 314-320.
- Hamid I. contribution a la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*punica granatum* L.) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de doctorat en science agronomique. L'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal (Maroc) 2013.
- Harborne B-J, Williams C-A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55 : 481-504.
- Heim K-E, Tagliaferro A-R, Bobilya D-J. "Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002 ;13 : 572–584 .
- Hemwimon S, pavasant P, Shotipruk A. Microwave assisted extraction of antioxydative anthraquinones from roots of *morindacitrifolia*. *Separation and purification technology* 2007; 54 :44-50.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux sources utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress Oxydatif. *Phytothérapie* 2004 ;1 :36.
- Holland D, Hatib K, Barya'akov I. Pomegranate : Botany, Horticuture, Breeding. *Horticultural Reviews* 2009; 35 :127-191.
- Hu B, He M. Pre-concentration and Sample Treatment Technique for Trace Element Analysis. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* 2012 ;3 : 365-395.
- Huang J, He W, Yan C, Du X, Shi X. Microwave-assisted extraction of flavonoids from pomegranate peeling and its antioxidant activity. *Bio Web Conferences* 2017; 8: 1–6.
- Huet R. Constituents of Citrus fruits with pharmacodynamic effect: Citroflavonoids. *Fruits* 1982 ;37 :267-271.
- Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F-C-B, Tossou M, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us ? . Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 ;2016 :1-9.
- Izadyan P, Hemmateenejad B. Multi-Response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian Basil using central composite design. *Food chemistry* 2016; 190: 864-870.

- Jaisinghani R-N, Makhawana S, Kanojia A. Study on antibacterial and flavonoid content of ethanolic extract of *Punica granatum* (pomegranate) peel. *Microbiology Research* 2018; 9 :74-80.
- Jean T, Bodinier M- C. Mediators involved in inflammation : Effects of Daflon 500 mg on their release. *Angiology* 1994 ; 45 : 554-559.
- Jingjing L, Qipeng Y. A new method for ellagic acid production from pomegranate husk. *Journal Food Process Engin* 2008; 31 : 443–454.
- Jurenka J-S. Anti-inflammatory properties of curcumin a major constituent of *Curcuma longa* : a review of preclinical and clinical research. *Alternative medicine review* 2009 ;14(2) : 41-53.
- Kadam S-U, Tiwari B-K, Alvarez C, Donnell C-P-O. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends Food Science Technology* 2015; 46 : 60–67.
- Kaderides K, Goula A-M, Adamopoulos A. process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *Innov Food science Technology emergency* 2015 ; 31 : 204–215
- KaracabeyE,Mazza G. Optimisation de l'activité antioxydante des extraits de canne de raisin à l'aide de la méthodologie de surface de réponse. *Food Chemistry* 2010 ;119 : 343–348.
- Kaul T-N, Middleton E, Ogra P-L. Antiviral effects of flavonoids on human viruses. *Journal Medecin Virologie* 1985; 15 : 71- 79.
- Keskin Çavdar H, Koçak Yanık D, Gök U, in Göğüş F. Optimisation of Microwave-Assisted Extraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil and Evaluation of Its Physicochemical and Bioactive Propertie. *Food Technology. Biotechnology* 2017 ;55 :86-94.
- Khalidi M, G. Barech G, H. Bendjedou H, Aouari I. First detection and infestation levels of the invasive fruit fly *Zaprius indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) in pomegranate orchards from Algeria. *African Entomology* 2021 ; 29 : 173-179.
- Khan M-K, Abert Vian M, Fabiano-Tixier A-S, Dangles O, Chemat F. *Food Chimestry. Review of green food processing techniques* 2010 ;119 :851–858.
- Khouchlaa A, Talbaoui A, El Yahyaoui El Idrissi A, Bouyahya A-S, Ait Lahsen S, Kahouadji A, Tijane M. Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité litholytique in vitro sur la lithiase urinaire d'extrait de *Zizyphus lotus* L. d'origine marocaine. *Phytothérapie* 2018 ; 16 :14-19.
- KKHY H-O, Ferruzzi M-G, Liceaga A-M, San Martín-González M-F. Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Eff ect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields. *LWT – Food Science Technology* 2015 ;62 :8-160.
- Kumar A, Rao PS. Optimization of pulsed-mode ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2020; 14 :3493–3507.
- Kumar N, Goel N. phenolic acids : natural vesrsatile molecules with promising therapeutic application. *Biothechnology rapports* 2019 ;24 : 1-10.
- Kumar S, Sharma U-K, Sharma A- K, Pandey A K .Protective efficacy of *Solanum xanthocarpum* root extracts against free radical damage: phytochemical analysis and antioxidant effect.” *Cellular and Molecular Biology* 2012 ;58 : 174–181.
- Lansky E, Shubert S, Neeman I. Pharmacological and therapeutic of pomegranate. *Ciham Options Mediterran* 1997 ; 5 :231-235.

Références bibliographiques

- Ledesma-escobar C-A, Priego-capote F. Comparative study of the effect of auxiliary energies on the extraction of Citrus fruit components. *Talanta* 2015 ; 144 : 522–528.
- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. évaluation of antioxydant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* 2006 ;96: 254-260.
- Lojkowska E, Hołubowska M. The Role of Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Potato Tuber Resistance to Soft Rot Caused by *Erwinia carotovora*. *Journal of Phytopathology* 1992 ;136 : 319—328.
- Lucchesi M-E. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en Sciences et Technologies. Université de la Réunion (France).2005.
- Luna-Guevara M-L, Luna-Guevara J-J, Hernández-Carranza P, Ruíz-Espinosa H, Ochoa-Velasco C-E. Phenolic Compounds : A Good Choice Against Chronic Degenerative Disease. *Studies in Natural Products Chemistry* 2018; 59 : 79-108.
- Luque-García J-L, Luque de Castro M-D. Ultrasound assisted Soxhlet extraction : an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Chromatography* 2004 ; 22 : 41-47.
- Lysiuk R, Hudz N. Differential Spectrophotometry : Application for Quantification of Flavonoids in Herbal Drugs and Nutraceuticals. *International Journal of Trends in Food Nutrition* 2017 ; 1 : 102.
- Mabrouk O-S, El-Sayed Shaltout O, Aly Amin W, Mustafa Ezz T-H, AM Zeitoun. Evaluation of Bioactive Compounds in Pomegranate Fruit Parts as an Attempt for Their Application as an Active Edible Film. *Journal of Biomaterials* 2019; 3(1): 7-17.
- Magangana T-P, Pearl Makunga N , Amos Fawole O , Linus Opara U. Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Waste. *A Review molecules* 2020 ;25 :1-34.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols : Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004 ;79 : 727-747.
- Manso T, Lores M, de Miguel T. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. *Antibiotics* 2020 ;11 :1-46.
- Martens S, Preu A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases : Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana L.* *Phytochemistry* 2010 ; 71 : 1040–1049.
- Melgarejo P, Nunez-Gomez D, Legua P, Martinez –Nicolas J-J, Al-mansa M-S. pomegranate(*punica granatum L.*) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. *Trend in food science and technology* 2020; 102 :232-236.
- Middha S-K, Usha T, Pande V. A Review on Antihyperglycemic and Antihepatoprotective Activity of Eco-Friendly *Punica granatum* Peel Waste. *EvidenceBased Complementary and Alternative Medicine* 2013 :1-11.
- Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/sciences* 2011 ;27 : 405-412.
- Mishra A, Kumar S, Pandey A K. "Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*." *The Scientific World Journal* 2013 :1-8.

- Mishra A, Sharma A-K, Kumar S, Saxena K, Pandey A-K. "Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities." *BioMed Research International* 2013 :1-10.
- Mohammad S-M and. Kashani H-H. Chemical composition of the plant *Punica granatum* L. (pomegranate) and its effect on heart and cancer. *Journal of Medicinal Plants Research* 2012 ; 6 : 5306–5310.
- Mokgalaboni K , Dlamini S , Wendy N. Modjadji P P ,Sogolo L. Lebelo. The Impact of *Punica granatum* Linn and Its Derivatives on Oxidative Stress, Inflammation, and Endothelial Function in Diabetes Mellitus: Evidence from Preclinical and Clinical Studies antioxidants 2023 ;12 : 1566.
- 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, *Journal DDT* 2019 : 25-29.
- Moorthy I-G, Maran J-P, Surya S-M, Naganyashree S, Shivamathi C-S. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal Biology Macromol* 2015; 72: 1323–1328.
- Motikara P-D, Pavankumar R. More & Shalini S. A novel, green environment-friendly cloud point extraction of polyphenols from pomegranate peels: a comparative assessment with ultrasound and microwave-assisted extraction. *Separation Science and Technology* 2020 :1-12.
- Mukherjee S, Ghosh S, Choudhury S, Gupta P, Adhikary A, Sreya Chattopadhyay. Pomegranate Polyphenols Attenuate Inflammation and Hepatic Damage in Tumor-Bearing Mice: Crucial Role of NF- κ B and the Nrf2/GSH Axis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2021 ; 97 : 1-13.
- Mulinacci N, Innocenti M, Bellumori M, Giaccherini C, Martini V, Michelozzi M. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. *Talanta* 2011;85(1) :76-167.
- Muñiz-Márquez D-B, Martínez-Ávila G-C, Wong-Paz J-E, Belmares-Cerda R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry* 2013; 20(5) :1149-1154.
- Mushtaq M, Sultana B, Anwar F, Adnan A, Rizvi S- S- H. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *JournalSupercritic Fluids* 2015; 104: 122–131.
- Nelly M-T, Ayora-Talavera T, HugoE-A, Angeles S-C, Neith P. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* 2017;7 :1- 47.
- Nhlanhla M, Jeremiah O-U, Nelisiwe P-M, Chijioke O, Sogolo L-L. Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L. (pomegranate) plant extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022 ;153 : 2-23.
- Nijveldt R-J, van Nood E, Van Hoorn D-E-C , Boelens P-G , van Norren K, van Leeuwen P-A-M, "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications." *American Journal of Clinical Nutrition* 2001 ;74 : 418– 425.
- Nugteren D-H, Christ-Hazelhof E, Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* 1987 ;33 : 403-417.
- Onwude D-I, Hashin N, Janius R-B, Nawi N-M, Abdan K. Modeling the thin-layer drying of fruits and vegetables: A review *Innovation Food Science Emerg Technology* 2016 ;15 : 559–618.

Orak H-H, Yagar H, Isbilir S-S. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Science Biotechnology* 2012 ;21: 87-373.

Osorio-Tobón J F. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Food Science Technology* 2020 ;57 : 4299-4315.

Otambailo A-M, Bhandary B-S-K, Sharmila K-P, protective effect of punica granatum Extract in Head and Neck cancer patients undergoing radiotherapy indian journal of Otolaryngology and Head & Neck surgery 2019;71 :318-320.

Oteiza P-I, Erlejman A-G, Verstraeten S-V, Keen C-L, Fraga C-G , “Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface?”. *Clinical and Developmental Immunology* 2005 ;12 : 19–25.

Panche A -N, Diwan A -D, Chandra S- R. Flavonoids : an overview. *Journal of nutritional science* 2016 ;5 :1-15.

Pereira D-M, Valentão P, Pereira J-A, Andrade P-B. Phénoliques : de la chimie à la biologie. *Molécules* 2009; 14(6) :2202 -2211.

Perron N- R, Brumaghim J- L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry Biophysique* 2009; 53 :75-100.

Peršurić Z, Saftić Martinović L, Malenica M , Gobin I , Pedisić S, Dragović-Uzelac V , Kraljević Pavelić S. Assessment of the Biological Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. *Molecules* 2020 ;25 :5916.

Pingret D, Fabiano-Tixier A-S, Chemat F . Ultrasound-assisted extraction. In: Rostagno MA, Prado JM (eds) *Natural product extraction: principles and applications*, 1st edn. The Royal Society of Chemistry: Dorchester 2013: 89–112.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 2009 ; 4 :25-39.

Proestos C, Komaitis M. Antioxidant Capacity of Hops .*Beer in Health and Disease Prevention* 2009 :467-474.

Rathod N-B, Elabed N, Punia S, Ozogul F, Kim S-K, Rocha J-M. 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 C-A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999 ; 26 : 1231-1237.

Ribéreau-Gayon P. *Les composés phénoliques des végétaux* : Editions Dunod, 1968 : 254.

Rosa P-T, Parajo J -C, Domínguez H, Moure A, Díaz-Reinoso B, Smith R- L, Toyomizu M, Florusse LJ, Peters C- J, Goto M, Lucas S, Meireles M-A. A Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: Meireles MAA (ed) *Extracting bioactive compounds for food products*, 1st edn. CRC Press(New York) 2009 : 269–288.

Rotelli A- E , Guardia T, Juarez A -O, De La Rocha N- E , Pelzer L -E . “Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation.” *Pharmacological Research* 2003 ;48 :601-606.

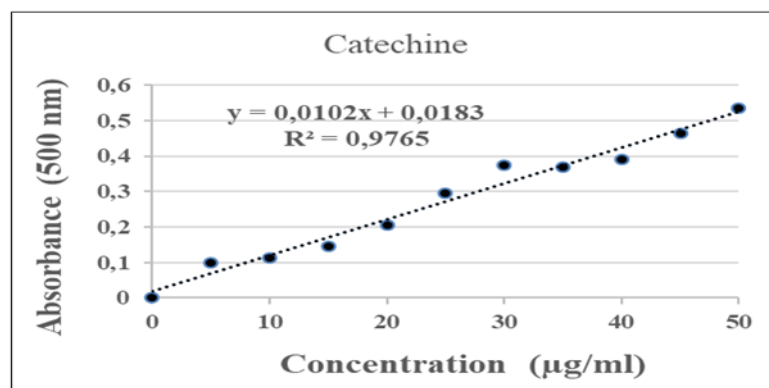
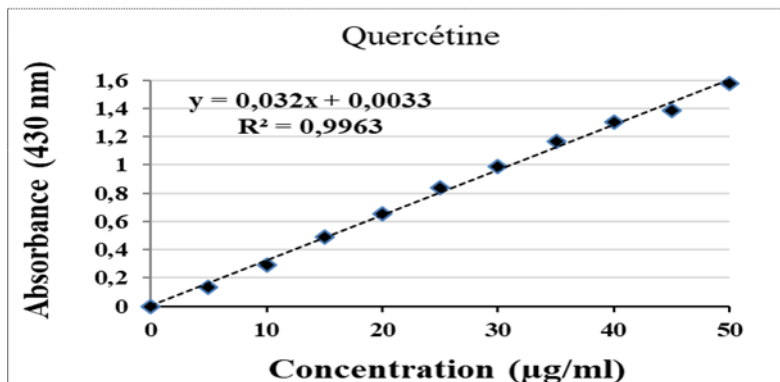
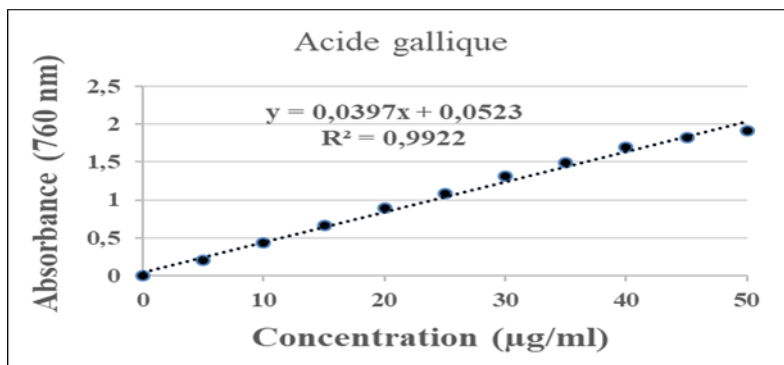
Rummun N, Somanah H, Ramasaha S, Bajorun T, Vidushi S. Bioactivity of Nonedible Parts of *Punica granatum* L : A Potential Source of Functional Ingredients. *International Journal of Food Science* 2013 : 1-12

- Sagar V-R, Kumar S-P. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: A review. *Journal Food Scientific Technology* 2010 ; 47: 15–26.
- Sánchez-Marzo N, Lozano-Sánchez J, Cádiz-Gurrea M, Herranz-López M, Micol V, Segura-Carretero A. Relationships Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Isolated Phytocompounds from Lemon Verbena. *Antioxidants* 2019; 8 : 324.
- Sandhar H- K, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 2011;1 :25-41.
- Saniee P, Hajimahmoodi M, Foroumadi P, Hosseinzadeh H, Safavi M, Siavoshi F. Antibacterial activity of plant extracts against *H. pylori*. *At Helicobacter* ; WileyBlackwell. Inc Malden MA USA 2009 ;14 : 393–394.
- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R, “Polyphenols, intracellular signalling and inflammation.” *Annali dell’Istituto Superiore di Sanita* 2007 ;43: 394–405.
- Santiago M, Gouvea S , Godoy R. Analytical standards production for the analysis of pomegranate anthocyanins by HPLC, Brazilian. *Journal of Food Technology* 2014 ;17: 51–57.
- Schubert SY, Lansky PE, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 66: 11–17.
- Selin Sahin RS. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound- assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason sonochem* 2013 ;20 :595-602.
- Selvamuthukumar M, Shi J. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety* 2017; 1(1) : 61-81.
- Serem A, Milogo-Rasolodimby J, Guinko S, Nacro M. Propriétés Thérapeutiques des plantes a tanins du Burkina-Faso. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines* 2008 ; 15 : 41 – 49
- Shams Ardekani M-R, Hajimahmoodi M, Oveisi M-R, Naficeh N, Jannat B, Ranjbar A-M, Gholam N, Moridi T. Activité antioxydante comparative et teneur totale en flavonoïdes des cultivars de grenade de Perse (*Punica granatum L.*). *Iranian journal of Pharmaceutical Research* 2011 ;10(3) : 519–524.
- Sharayei P, Azarpazhooh E, Zomorodi S , Ramaswamy H-S. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel *LWT* 2019 ;101 : 342–350.
- Sharma J, Maity A. Pomegranate phytochemicals: nutraceutical and therapeutic values. *Fruit, Veg. Cereal Science. Biotechnology* 2010 ; 4 (2) :56-76.
- Singla R-K, Dubey A-K., Garg A, Sharma R-K., Fiorino M, Ameen S-M, Haddad M-A, Al-Hiary M. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal. AOAC International* 2019 ;102 :1397–1400.
- Smeriglio A, Barreca D, a Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology* 2017 ; 174 : 1244–1262.
- Snehal N-M, Jayesh B-D, Sangita B-K. Archana R-J. Attenuation of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2017; 7(3) : 273-280.
- Sobhani Z, Reza N-S, Ahmad E-S, Sahebkar A, Javadi B. Medicinal Plants Targeting Cardiovascular Diseases in View of Avicenna. *Bentham Science Publishers* 2017 ;23(16): 2428-2443.

- Sood A , Gupta M, Extraction Process Optimization for Bioactive Compounds in Pomegranate Peel. *Food Bioscience* 2015 ; 12 : 100–106.
- Surućića R, Maja T, Miroslav P, Biljana T, Miloš P. Stojilkovi CD, Milkica G, Katarina S, Gordana Z, Ranko S. Pomegranate peel extract polyphenols attenuate the SARS-CoV-2 S-glycoprotein binding ability to ACE2 Receptor : In silico and in vitro studies. *Bioorganic Chemistry* 2021; 114 : 105-145.
- Tabaraki R, Heidarizadi E, Benvidi A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology. *Sep Purification Technology* 2012 ;98 :16–23.
- Taghvaei M, Jafari S-M, Assadpoor E, Nowrouzieh S, Alishah O. Optimization of microwave-assisted extraction of cotto seed oil and evaluation of its oxidative stability and physicochemical properties. *Food Chemistry* 2014 ;160 :7-90.
- Tanase C, Bujor O-C, Popa V-I. Phenolic Natural Compounds and Their Influence on Physiological Processes in Plants. *Polyphenols in Plants (Second Edition) Isolation, Purification and Extract Preparation* 2019 : 45-58.
- Teixeira J, Gaspar A, Garrido M, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International* 2013 : 1-11
- Thotambailu A-M, Bhandary B, Sharmila K-P, Protective effect of *Punica granatum* extract in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy,” *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery* 2019 ; 71 : 318–320.
- Tomás-Barberán A-F, Clifford M-N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80 (7) : 1073-1080.
- Tordera M, Ferrandiz M -L, Alcaraz M- J, “Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils.” *Zeitschrift fur Naturforschung Section C* 1994 ;49 : 235–240.
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010 ; 2 :1231–1246.
- Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Classification of Phenolic Compounds in Plants. *Polyphenols in Plants (Second Edition) : Isolation, Purification and Extract Preparation* 2019 : 263-284.
- Tsukui A, Santos Júnior H-M, Oigman S-S, de Souza ROMA, Bizzo H-R, Rezende C-M. Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. *Food Chemistry* 2014 ;164:71-266.
- Tückmantel W, Kozikowski A-P, Romanczyk L-J. Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. I. Preparation of Building Blocks from (+)-Catechin. Procyanidin Formation. Synthesis of the Cancer Cell Growth Inhibitor, 3-O-Galloyl-(2R,3R)-epicatechin-4 β ,8-[3-O-galloyl-(2R,3R)-epicatechin] .*American chemical society* 1999 : 2073–12081.
- Ventrella M-C, Marinho C-R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* D-C. (Boraginaceae) leaves. *Revista Brasil Boticario* 2008 ;31 :457-467.
- Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 2001 ;8 : 303-313.
- Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals, *Cardiovascular Research* 2000 ;47 : 419–425.

- Vu H-T, Scarlett C-J, Vuon Q-V. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity from banana (*Musa cavendish*) peel. *Journal Food Process Preserv* 2016 ;1-14.
- Vuolo M-M, Lima V-S , Junior M-R-M. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications* 2019 :33-50.
- Wang H-X. The characteristics of Mudanhua pomegranate variety and its cultural techniques. *South China Fruits* 2003 ;32(1) :49-50.
- Wang R, Ding Y, Liu R, Xiang L, Du L. Pomegranate : constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit. Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 2010 ;4 (2) : 77–87.
- Wenxia Wu, Shan J, Mengmeng L, Shuge T . Simultaneous process optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols and ellagic acid from pomegranate (*Punica granatum L.*) flowers and its biological activities . *Ultrasonics Sonochemistry* 2021 ;80 : 1-10.
- Wink M. Phytochemical diversity of secondary metabolites. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. New York: Marcel Dekker 2004 : 915–919.
- Wu T, Yan J, Liu R, Marcone M-F, Aisa H-A, Tsao R. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. *Food Chemistry* 2012 ;133 : 8-1292.
- Würidig G, Woller R. *Chemie des Weines. Eugen Ulmer GmbH*. allemand :Stuttgart ,1989 :1-926.
- Yang R, Geng L, Lu H , Fan X. Ultrasound-synergized electrostatic field extraction of total flavonoids from *Hemerocallis citrina baroni*. *Ultrasonics Sonochemistry* 2017 ;34 : 571-579.
- Yu M, Gouvinhas I, Rocha J, Ana I. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific Reports* 2021; 11: 1-14.
- Zhang H , Tsao R . Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* 2016; 8 :33–42.
- Zhao X , Yuan Z. Anthocyanins from Pomegranate (*Punica granatum L.*) and Their Role in Antioxidant Capacities in Vitro. *Chem Biodiversity* 2021 ;18 (10) :1-16.
- Zheng X, Liu B, Lil , Zhu X. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds pomegranate peel compounds. *Journal Medecin Plants Research* 2011; 5: 1004-1011.
- Živković J, Šavikin K, Janković T, Čujić N, Nebojša Menković. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 2018 ;194 : 40–47.

Annexes



Annex 01 : Droites standards pour le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés.

Résumé

Le grenadier (*Punica granatum*) est un arbuste appartenant à la famille des *Punicaceae*. Depuis l'antiquité, ses différentes parties sont utilisés en médecine traditionnelle pour traiter différentes maladies. L'objectif de notre étude est de déterminer quelques paramètres expérimentaux influant sur la teneur des polyphénols totaux extraits à partir de la pelure de grenade par ultrasons. L'analyse statistique des résultats a permis de déterminer les conditions d'extraction optimale dont le pourcentage du solvant hydroéthanolique (20%), l'amplitude (80%) et le temps d'extraction (5min). L'extrait de la pelure de *Punica granatum* obtenu après optimisation de l'extraction assistée par ultrasons a montré des teneurs considérables en composés phénoliques. Le dosage des polyphénols totaux était de 345.42 ± 4 mg AG /g, les flavonoïdes totaux de 11.32 ± 0.816 mg Eq Q/g, et les tanins condensés a révélé une valeur de 28.31 ± 0.71 mg EC/g. Par ailleurs, l'analyse de l'activité antioxydante a montré un potentiel anti-radicalaire envers le DPPH et l'ABTS (0.27 mmol Eq.Trolox/g et 3.347 ± 0.28 mmol Eq.Trolox/g, respectivement). De plus, le pouvoir antioxydant réducteur du fer était de 6.25 ± 0.21 mmolFe²⁺/g. L'ensemble de ces résultats confirment que la pelure de grenade est une source riche en antioxydants pouvant justifier ses applications en phytothérapie.

Mots-clés : pelure de grenade, *Punica granatum*, optimisation, ultrasons, polyphenols, activité antioxydante.

Abstract

The pomegranate tree (*Punica granatum*) is a shrub belonging to the *Punicaceae* family. Since ancient times, various diseases have been treated using its various parts in traditional medicine. The objective of the present study is to determine some experimental factors influencing the content of total polyphenols extracted from the pomegranate peel by ultrasound. The optimal extraction conditions, including the percentage of hydroethanolic solvent (20%), amplitude (80%), and extraction time (5min), were determined by the statistical analysis comparing the different TPC. The *Punica granatum* peel extract obtained after optimization of ultrasonic extraction showed considerable concentrations of phenolic compounds. The total polyphenols value was 345.42 ± 4 mg GAE/g, the total flavonoids of 11.32 ± 0.816 mg EqQ/g, and the condensed tannins revealed a value of 28.31 ± 0.71 mg EC/g. In addition, the antioxidant activity analysis showed an antioxidant potential towards DPPH and ABTS (0.27 mmol Eq.Trolox/g and 3.347 ± 0.28 mmol Eq.Trolox/g, respectively). Furthermore, the antioxidant reducing power of iron was 6.25 ± 0.21 mmolFe²⁺/g. These results confirm that pomegranate peel is a rich source of antioxidants that can justify its applications in herbal medicine.

Keywords: pomegranate peel, *Punica granatum*, ultrasounds, polyphenols, antioxidant activity.