

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biotechnologie

Réf :.....

# Mémoire

Présenté par

M<sup>elle</sup> CHIKH Amel et M<sup>elle</sup> OUATATI Fifi

Pour l'obtention du diplôme de

**Master Académique/Professionnel**

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et Santé

Thème

**Analyse du potentiel antioxydant de la pelure de grenade : Valorisation  
d'un sous-produit naturel.**

Soutenu le : 02 Juillet 2024

Devant le Jury composé de :

M<sup>me</sup> REMILA S.

MCB

Président

M<sup>me</sup> ABDELOUHAB K.

MCA

Encadrant

M<sup>me</sup> SLIMANI S.

MAA

Examineur

Année Universitaire : 2023/2024

## *Remerciements*

À l'issue de ce travail de fin d'études, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, nous souhaitons remercier **M<sup>me</sup> Abdelouhab K.** pour son encadrement, ses précieux conseils et son soutien tout au long de ce projet. Sa rigueur scientifique et ses encouragements constants ont été essentiels à l'aboutissement de ce travail.

Nous remercions également **M Boudjouane F.** pour ses remarques pertinentes et son aide précieuse lors des différentes étapes de ce travail.

Nous tenons à remercier vivement les membres du jury, **M<sup>me</sup> Slimani S.** et **M<sup>me</sup> Remila S.** qui ont bien voulu prendre de leur temps pour examiner ce travail.

Un grand merci aux ingénieures du laboratoire de biotechnologie, **M<sup>me</sup> Ouaz R.** et **M<sup>me</sup> Hamitouche S.** pour leur accueil chaleureux et leur présence tout au long de la réalisation de la partie pratique de ce travail.

Nous souhaitons également exprimer notre gratitude à tous nos amis et collègues pour leurs encouragements et leur soutien moral tout au long de ce parcours. Leur présence a été d'une grande aide durant les moments de doute et de fatigue.

Enfin, nous tenons à remercier les membres de nos familles pour leur amour inconditionnel et leur soutien indéfectible.

À tous, nous vous adressons nos sincères remerciements.

**CHIKH Amel & OUATATI Fifi.**

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	01
---------------------------	----

### Partie théorique

#### **I. La grenade (*Punica granatum*)**

I.1. Description générale du grenadier.....	02
I.2. Classification botanique.....	03
I.3. Usage thérapeutique en médecine traditionnelle.....	04
I.4. Composition chimique et propriétés biologiques.....	04

#### **II. Stress oxydant et radicaux libres**

II.1. Stress oxydant.....	08
II.2. Radicaux libres.....	08
II.3. Dommages oxydatifs des radicaux libres.....	10
II.4. Antioxydants.....	12

#### **III. Les polyphénols**

III.1. Classification des polyphénols.....	13
III.2. Propriétés biologiques des polyphénols.....	16
III.3. Méthodes d'extraction des polyphénols.....	18

### Partie expérimentale

#### **I. Matériel et méthodes**

I.1. Matériel.....	21
I.2. Méthodes.....	21
I.2.1. Préparation des extraits.....	21
I.2.2. Dosage des polyphénols totaux.....	22
I.2.3. Analyse de l'activité scavenger de radicaux libres.....	22
I.2.4. Analyse statistique.....	24

#### **II. Résultats et discussion**

II.1. Contenu en polyphénols totaux.....	25
------------------------------------------	----

II.2. Evaluation du pouvoir scavenger des radicaux libres.....	28
II.2.1. Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène.....	28
II.2.2. Activité scavenger du radical hydroxyle.....	31
II.2.3. Activité scavenger du monoxyde d'azote.....	34
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>37</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>39</b>

## Liste des abréviations

ACE2 : Angiotensin-Converting Enzyme 2 (Enzyme de conversion de l'angiotensine 2).

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AG : Acide Gallique.

AGE : Advanced Glycation End products (Produit de glycation avancée).

AGPI : Acide gras polyinsaturé.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

ATP : Adénosine triphosphate.

CAT : Catalase.

Coenzyme Q10 : Ubiquinone-10.

COVID-19 : Coronavirus Disease 19.

Cox-2 : Cyclooxygénase-2.

EI : Extrait d'infusion.

EM : Extrait de macération

EPG : Extrait de pelure de grenade.

ERA : Espèces réactives azotées.

ERO : Espèces réactives oxygénées.

ES : Extrait de Soxhlet.

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase.

GC : Guanylate Cyclase.

GPx/GR : Glutathion peroxydase/Glutathion réductase.

GSH : glutathion réduit.

G-S-S-H : glutathion oxydé.

GSH-Px : glutathion peroxydase.

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression).

IL- : Interleukine.

iNOS : Inducible nitric oxide synthase (Oxyde nitrique synthase).

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP Kinase)

MDA : Malondialdéhyde.

NADP<sup>+</sup> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène.

NK : Natural Killer (Cellules tueuses naturelles).

NOS : Monoxyde d'azote synthase.

Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2 (Facteur de transcription Nrf2).

PGA : Pyroglutamic Acid (Acide pyroglutamique).

PPG : Poudre de pelure de grenade.

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase.

Protéine S : Protéine Spike/Spicule.

SARS-CoV-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère).

SOD : Superoxyde dismutase.

TAMs : Tumor-Associated Macrophages (Macrophages associés aux tumeurs).

4-HNE : 4-hydroxynonéal.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Les différentes parties de <i>Punica granatum</i> L. ....	03
<b>Figure 02</b> : Propriétés pharmacologiques de différentes parties de <i>Punica granatum</i> L.....	07
<b>Figure 03</b> : Effet des ERO/ERA sur les biomolécules.....	10
<b>Figure 04</b> : Structures chimiques des différents acides phénoliques.....	14
<b>Figure 05</b> : Structures chimiques et sous-classes des flavonoïdes.....	15
<b>Figure 06</b> : Représentation schématique des méthodes d'extraction conventionnelles par macération et Soxhlet.....	19
<b>Figure 07</b> : Représentation schématique des trois méthodes d'extraction.....	21
<b>Figure 08</b> : Droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de différentes concentrations de l'acide gallique .....	26
<b>Figure 09</b> : Contenu en polyphénols totaux dans les extraits obtenus par les trois méthodes d'extraction.....	26
<b>Figure 10</b> : Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) par les trois extraits de pelure de grenade <i>Punica granatum</i> et l'acide gallique.....	29
<b>Figure 11</b> : Effet scavenger du radical hydroxyle (OH·) par les trois extraits de pelure de grenade <i>Punica granatum</i> et l'acide gallique.....	32
<b>Figure 12</b> : Effet scavenger du monoxyde d'azote (NO) par les trois extraits de pelure de grenade <i>Punica granatum</i> et l'acide gallique.....	35

# **Introduction**

## Introduction

La grenade (*Punica granatum*) est un fruit appartenant à la famille des Punicaceae. Elle est depuis très longtemps connue pour son utilisation en médecine traditionnelle en raison de ses innombrables bienfaits pour la santé, d'ailleurs souvent désignée par « super fruit » (Vučić *et al.*, 2019 ; Eghbali *et al.*, 2021). La grenade est également utilisée en industrie agroalimentaire pour la production de jus, de confiture, d'huile, de gelée et de sirop. Cependant, ceci génère des quantités importantes de déchets dont principalement les pelures. Cette partie non comestible s'est particulièrement avérée être une excellente source de composés bioactifs (Trabelsi *et al.*, 2020 ; Mo *et al.*, 2022).

La majorité des espèces végétales étudiées possèdent des propriétés biologiques bénéfiques pour la santé de l'Homme. Ces activités reposent sur des molécules issues de leur métabolisme secondaire. Les polyphénols, largement retrouvés chez les végétaux, sont une classe majeure des métabolites secondaires considérés comme molécules bioactives. En effet, ces molécules possèdent un large spectre de propriétés biologiques notamment l'activité antioxydante (Cutrim et Cortez, 2018 ; Mo *et al.*, 2022). Ces composés sont extraits par différentes méthodes d'extraction notamment l'infusion, macération et Soxhlet (Frosi *et al.*, 2021).

Par ailleurs, le stress oxydant est un état de déséquilibre endogène qui se traduit par une production excessive d'espèces réactives hautement toxiques pour l'organisme appelées radicaux libres, face à un système antioxydant insuffisant. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le radical hydroxyle (OH•) et le monoxyde d'azote (NO•) sont parmi ces espèces réactives responsables de plusieurs dommages cellulaires affectant les protéines, les lipides et l'ADN. Il en résulte, à long terme, différentes maladies chroniques, telles que les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et le cancer (Pizzino *et al.*, 2017 ; Baudin, 2020).

Dans la médecine traditionnelle algérienne, *Punica granatum* occupe une place importante en raison de ses multiples usages thérapeutiques, notamment, dans le traitement des affections gastro-intestinales (Ouelbani *et al.*, 2016).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressées à la valorisation d'un sous-produit naturel qui est la pelure de grenade. Nous avons d'abord quantifié les teneurs en composés phénoliques contenus dans les extraits préparés par infusion, macération et Soxhlet. Ensuite, nous avons évalué leur capacité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), du radical hydroxyle (OH•) et du monoxyde d'azote (NO•). L'ensemble de ces essais a été effectué à différentes concentrations afin de comparer leur activité antioxydant.

# **Rappels bibliographiques**

---

### I. La grenade (*Punica granatum*)

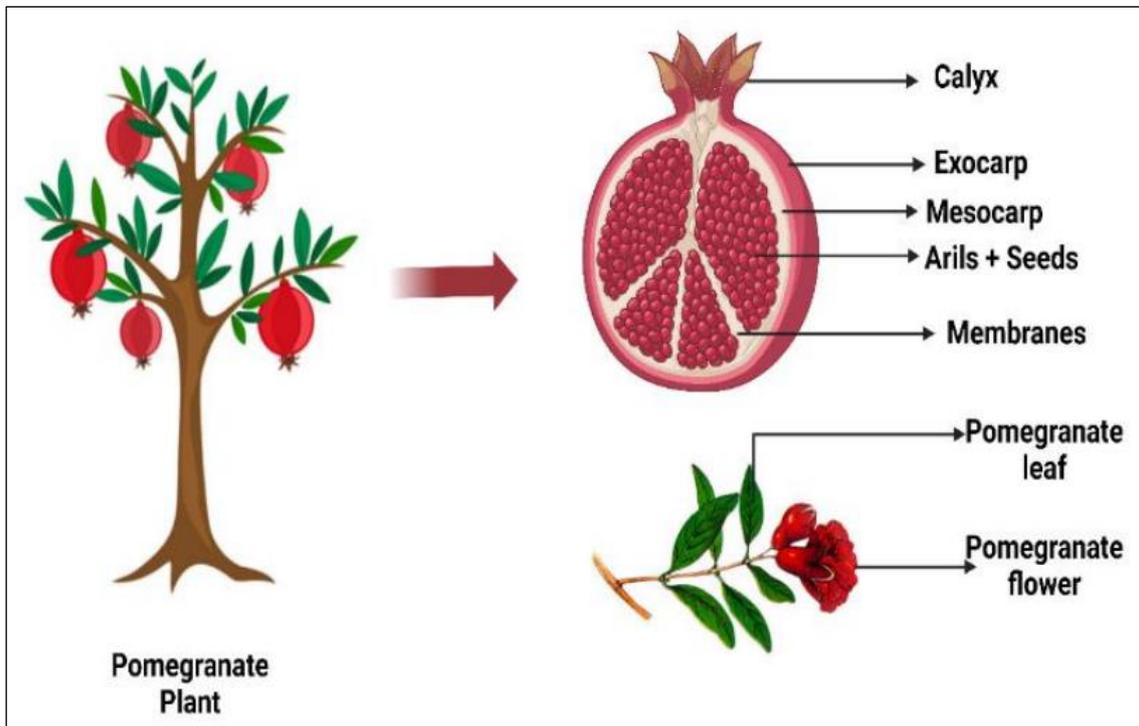
#### I.1. Description générale du grenadier

Le grenadier est un arbuste originaire d'Iran et d'Afghanistan, cultivé dans plusieurs régions du monde telles que l'Amérique, le Moyen-Orient, l'Afrique du Nord et tropicale, ainsi qu'en méditerranée et en Sicile (Sharma *et al.*, 2017 ; Vučić *et al.*, 2019).

Le grenadier est un arbuste à troncs multiples, torsadés et épineux, à feuilles caduques dans les régions tempérées et à feuilles persistantes dans les régions froides. Sa taille moyenne varie entre 5 et 8 mètres de haut mais peut atteindre jusqu'à 10 mètres. Les feuilles du grenadier sont vertes, lisses et allongées (Stover et Mercure, 2007 ; Urbaniak *et al.*, 2018).

Le grenadier est composé de différentes parties (Figure 01) ; la fleur est composée de 5 à 8 pétales de couleur orange vif. Elle fleurit entre le mois de mai et juillet. Par ailleurs, le fruit est une baie ronde entourée d'une enveloppe épaisse appelée l'exocarpe. Celui-ci est d'une couleur verte-jaunâtre à rouge. C'est la partie non-comestible du fruit, représentant 39 à 53% du fruit entier. La partie interne de l'enveloppe à paroi mince, appelée endocarpe, est de couleur blanche, laquelle forme des chambres contenant des arilles. Ces arilles sont constitués de jus rouge et acidulé dans lequel sont contenues des graines de forme triangulaire. Le jus représente 38 à 50% du fruit entier, tandis que les graines représentent 8 à 12%. L'enveloppe est caractérisée par une couronne appelée calice ou sépale (Viuda-Martos *et al.*, 2010 ; Venkitasamy *et al.*, 2019 ; Singh *et al.*, 2023).

Concernant les variétés du grenadier, plus de 764 cultivars ont été cultivés dans les villes de Sāveh et de Yazd en Iran. Ces cultivars possèdent des caractéristiques spécifiques, notamment la taille, la couleur, le goût, la période de maturation et la résistance aux maladies. Les variétés cultivées en Inde sont Bedana et Kandhari. Elles sont caractérisées par un taux élevé de pulpe d'où le nom de « grenade sans pépins » (Sheidai *et al.*, 2007 ; Coronado-Reyes *et al.*, 2020). La grenade peut être consommée tel qu'un fruit frais ou jus, ou encore transformée en confiture, huile, infusion, gelée, sirop ou sauce (Alexandre *et al.*, 2019 ; Trabelsi *et al.*, 2020).



**Figure 01** : Les différentes parties de *Punica granatum* L. (Singh *et al.*, 2023).

### I.2. Classification botanique

Le nom scientifique de la grenade est *Punica granatum* L. dont l'origine est latine, où « Punica » vient des mots « *Punicum malum* » qui signifie « la pomme de Carthage » et « granatum » qui signifie « graine » (Rana *et al.*, 2018).

- **Espèce** : *Punica granatum*.
- **Genre** : Punica.
- **Famille** : Punicaceae / Lytraceae.
- **Ordre** : Myrtales.
- **Division** : Magnoliophyta.
- **Classe** : Magnolipiosida
- **Sous-classe** : Rosidae.
- **Règne** : Plantae (Akhtar *et al.*, 2017 ; Rana *et al.*, 2018).

Des études moléculaires ont suggéré qu'un réexamen taxonomique pourrait classer « Punica » dans la famille des « Lytraceae » (Graham *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2020).

### I.3. Usage thérapeutique en médecine traditionnelle

La grenade connue sous le nom de « super fruit » a été utilisée depuis très longtemps en médecine traditionnelle pour traiter un large spectre d'affections (Sharma et Maity, 2010). En effet, les différents systèmes de médecine traditionnelle telle que la médecine chinoise, le système Ayurvéda, ainsi que le système Unani, utilisent *Punica granatum* pour soigner un grand nombre de maladies. Les deux systèmes, Ayurvéda et Unani, font partie de la médecine traditionnelle indienne, dans laquelle la grenade est considérée comme une pharmacie à part entière (Lloyd, 2009 ; Thangavelu *et al.*, 2017 ; Ge *et al.*, 2021).

En médecine traditionnelle chinoise, la pelure de *P. granatum* est utilisée pour ses effets hémostatiques, vermifuges et antiviellissement. En Ayurvéda, la pelure et la racine sont utilisées pour traiter la dysentérie et les ulcères grâce à leurs propriétés antiparasitaires. En Unani, on utilise la fleur pour traiter l'asthénie, ainsi que comme complément alimentaire contre le diabète. La graine est quant à elle utilisée pour traiter la coqueluche, les vomissements et les nausées (Arun et Singh, 2012 ; Tabbassum *et al.*, 2019 ; Ge *et al.*, 2021).

Par ailleurs, la pelure est utilisée par les Sud-Africains et les Chinois pour sa capacité astringente, dans le traitement de la diarrhée, les métrorragies et les maux de ventre. Elle est également connue pour son effet thérapeutique des inflammations chroniques, plus particulièrement l'inflammation du tractus digestif (Arun et Singh, 2012 ; Vučić *et al.*, 2019). De plus, l'extrait des racines de *Punica granatum* a révélé une efficacité dans la prévention des affections gynécologiques et l'infertilité (Jurenka *et al.*, 2018).

Toutes les parties du grenadier, telles que les racines, l'écorce, les feuilles, les fleurs et les graines, ont été utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne comme aliments médicinaux importants pour traiter les affections gastro-intestinales (Ouelbani *et al.*, 2016).

### I.4. Composition chimique et propriétés biologiques

#### I.4.1. Composition chimique de *Punica granatum*

En plus du fruit, les parties non comestibles de la grenade et du grenadier, telles que la pelure, les feuilles et les racines sont également une source de nombreuses substances bioactives aux vertus thérapeutiques connues depuis l'antiquité (Longtin, 2003 ; Lansky et Newman, 2007).

## Rappels bibliographiques

La pelure qui représente 50% du fruit est très riche en polyphénols, notamment les cathéchines (gallocatéchine), les ellagitanins et gallotanins, les flavonoïdes (quercétine) et les acides phénoliques (acide ellagique). La pelure contient également des polysaccharides complexes, ainsi que divers minéraux, principalement du potassium (K), de l'azote (N), du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), du phosphore (P), du magnésium (Mg) et du sodium (Na) (Viuda-Martos *et al.*, 2010 ; Jasuja *et al.*, 2013 ; Singh *et al.*, 2018).

Le jus est principalement composé de 85.4% d'eau et environ 1% de polyphénols dont des anthocyanes et anthocyanidines, des acides organiques (acide citrique et acide gallique), des flavonoïdes (quercétine et rutine), 10.6% de sucres et 1.4% de pectine. Le jus est également riche en minéraux tels que le cobalt (Co), le sodium (Na), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le césium (Cs), le sélénium (Se) et le zinc (Zn) (Arun et Singh, 2012 ; Moga *et al.*, 2021). L'huile de la graine contient l'acide gras triénoïque appelé acide punique, l'acide hydroxybenzoïque, les stérols et  $\gamma$ -tocophérol (Arun et Singh, 2012 ; Aruna *et al.*, 2016).

Concernant les parties du grenadier, les feuilles sont riches en tanins (punicafoline et punicaline), en glycosides de flavones, en lutéoline et apigénine. Les fleurs contiennent de l'acide gallique et des triterpénoïdes. Les racines contiennent essentiellement des alcaloïdes (Lansky et Newman, 2007 ; Arun et Singh, 2012 ; Saeed *et al.*, 2018).

Cette composition chimique issue du métabolisme secondaire confère à la grenade des propriétés biologiques ayant un impact bénéfique sur la santé. Leur teneur diffère en fonction du cultivar, du climat, de la région de culture ainsi que la méthode d'extraction (Lansky et Newman, 2007 ; Arun et Singh, 2012 ; Siriwardhana *et al.*, 2013).

### I.4.2. Propriétés biologiques de *Punica granatum*

*Punica granatum*, grâce à sa richesse en substances bioactives, est caractérisée par une variété d'activités et de propriétés biologiques (Figure 02), (Mushtaq *et al.*, 2015 ; Singh *et al.*, 2023). Les extraits de sa pelure ont des activités antioxydantes, antimicrobiennes et antifongiques significatives, ainsi que des propriétés cytotoxiques *in vitro*, attribuées particulièrement à leurs composés phénoliques (Alexandre *et al.*, 2019 ; Hlima *et al.*, 2019 ; Meselhy *et al.*, 2020).

#### I.4.2.1. Activité antioxydante

La propriété antioxydante de la grenade repose sur les différents composés phytochimiques, isolés à partir de ses parties comestible et non comestible, dont les anthocyanes, l'acide gallique

## Rappels bibliographiques

et les catéchines. L'activité antioxydante de ces substances bioactives s'exerce par le biais de différents mécanismes, tels que l'inhibition de la peroxydation des lipides, le piégeage ou la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Johanningmeier et Harris, 2011 ; Hussain *et al.*, 2016). Il a été démontré que le potentiel antioxydant de l'extrait de pelure de grenade est dix fois plus élevé que celui de l'extrait de pulpe. Le jus de grenade augmente également le mécanisme de défense antioxydant contre la toxicité reproductive induite par les radicaux libres (Li *et al.*, 2006 ; Al-Olayan *et al.*, 2014 ; Barathiannan *et al.*, 2016).

### I.4.2.2. Activité anti-inflammatoire

Les propriétés anti-inflammatoires de l'extrait de pelure de grenade ont été démontrées par un effet marqué sur l'expression de la cyclooxygénase-2 (Cox-2) (Houston *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'efficacité de l'extrait de la pelure de grenade a été montrée chez 62 volontaires atteints de colite ulcéreuse, où l'indice de l'activité de la colite a diminué après quelques semaines chez les patients étudiés (Kamali *et al.*, 2015). Une étude préliminaire a montré que la consommation de cet extrait était efficace pour réduire les symptômes chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. De même, dans un essai randomisé mené chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, l'activité de la maladie a été significativement réduite après 8 semaines de supplémentation en extrait de pelure de grenade (Rahimi *et al.*, 2012 ; Ghavipour *et al.*, 2017).

### I.4.2.3. Activité antimicrobienne

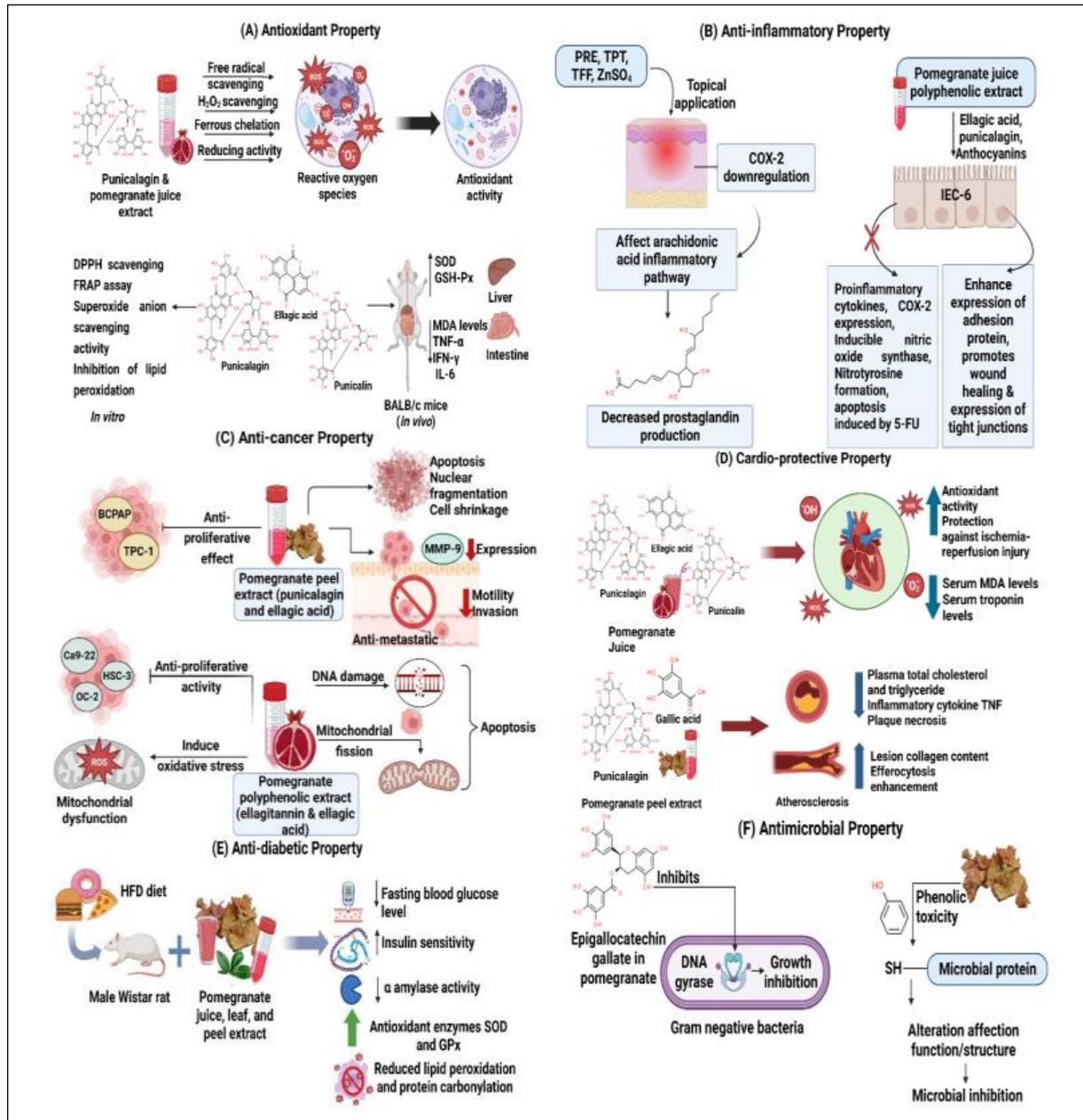
Le potentiel antibactérien des extraits de pelure de grenade a montré des résultats favorables contre diverses bactéries pathogènes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* et *Staphylococcus aureus* (Daoutidou, 2021). De plus, une étude menée par Suručić *et al.* (2021) a montré que l'inhibition de l'interaction entre la protéine S du SARS-CoV-2 et le récepteur ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) à l'aide de la grenade et d'autres substances phytochimiques pour la prévention, l'atténuation et le traitement du COVID-19 (Suručić *et al.*, 2021).

### I.4.2.4. Activité anticancéreuse

La grenade peut être utile dans la prévention et le traitement de plusieurs cancers, y compris le cancer du sein, le cancer du poumon et le cancer de la peau (Eroglu *et al.*, 2021 ; Teaima *et al.*, 2022). En effet, il a été révélé que ce fruit était capable de réduire le flux sanguin vers les tumeurs et par conséquent, la prolifération des cellules cancéreuses et peut également accélérer le processus d'apoptose. Plusieurs études ont révélé que l'extrait de pelure de grenade a de forts

## Rappels bibliographiques

effets anticancéreux et antimétastatiques sur le cancer de la thyroïde (Li *et al.*, 2016 ; Berdowska *et al.*, 2021). Ainsi, la grenade peut être utilisée comme agent chimiopréventif et chimiothérapeutique naturel pour lutter contre le cancer (Maphetu *et al.*, 2021).



**Figure 02 :** Propriétés pharmacologiques de différentes parties de *Punica granatum* L. (Singh *et al.*, 2023).

## II. Stress oxydant et radicaux libres

### II.1. Stress oxydant

Le stress oxydant est un état de déséquilibre endogène entre les radicaux libres et les antioxydants. Cette situation est observée lorsqu'un organisme vivant est soumis à différentes situations telles que l'exercice physique intense, le tabagisme ou encore le stress chronique. Ces situations génèrent un excès de radicaux libres qui dépasse la capacité de l'organisme à les neutraliser, et peut ainsi causer divers dommages structurels et fonctionnels des cellules (Baudin, 2020 ; Sebbar *et al.*, 2023).

#### II.1.1. Facteurs favorisant le stress oxydant

Le mécanisme naturel de la respiration est à l'origine de molécules réactives qui, lorsqu'elles sont en excès, vont oxyder les autres cellules et créer des perturbations des processus métaboliques. Le stress oxydant est dû à des facteurs d'origine endogène et exogène (Juránek *et al.*, 2013 ; Gillard, 2022) :

##### II.1.1.1. Facteurs endogènes

La respiration est la source principale à l'origine de molécules d'oxygène instables responsables des réactions délétères. D'autres sources telles que l'activation des cellules immunitaires (neutrophiles et macrophages), l'inflammation aiguë et chronique et le stress chronique, sont également impliqués dans la génération des espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 2007 ; Juránek *et al.*, 2013 ; Gillard, 2022).

##### II.1.1.2. Facteurs exogènes

La pollution atmosphérique, l'exposition excessive aux rayons UV, la pollution des intérieurs (composés organiques volatiles), le tabagisme, la consommation d'alcool et l'exposition aux pesticides sont les principaux facteurs exogènes du stress oxydant. Ces composés, une fois dans l'organisme, sont métabolisés en sous-produits toxiques tels que les radicaux libres (Valko *et al.*, 2007 ; Halliwell, 2007 ; Pizzino *et al.*, 2017).

### II.2. Radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule possédant un ou plusieurs électrons non-appariés au niveau de son orbite externe, ce qui le rend très réactif avec une demi-vie très courte. Pour retrouver leur stabilité, les radicaux libres capturent l'électron manquant d'autres composés, lesquels en perdant un électron deviennent à leur tour, instables. Ceci déclenche une

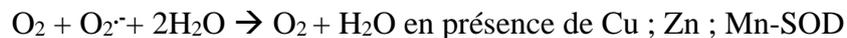
## Rappels bibliographiques

cascade de réactions qui aboutit à des dommages cellulaires (Sebbar *et al.*, 2023). Les radicaux libres sont formés par trois mécanismes différents ; un radical peut donner son électron non apparié à une autre molécule, il peut capturer l'électron d'une autre molécule afin de l'apparier ou il peut simplement se lier à la molécule (Buonocore *et al.*, 2010).

Au cours du stress oxydant, deux types d'espèces réactives sont générées ; les espèces réactives oxygénées (ERO) et les espèces réactives azotées (ERA). Elles sont soit sous forme radicalaire ou non radicalaire. La forme non radicalaire est formée par la liaison entre deux espèces radicalaires (Pham-Huy *et al.*, 2008 ; Birben *et al.*, 2012; Ouznadji, 2020).

### II.2.1. Le peroxyde d'hydrogène

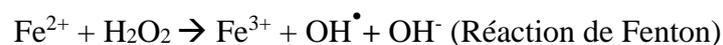
Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est une espèce réactive non radicalaire générée principalement comme sous-produit des réactions métaboliques, notamment, pendant la respiration cellulaire dans les mitochondries. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est capable de causer des dommages à des concentrations relativement faibles. A des niveaux plus élevés, les enzymes cellulaires productrices d'énergie, telles que la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), sont inactivées. Il peut aussi facilement traverser les membranes biologiques et endommager l'ADN en produisant le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) en présence d'ions métalliques de transition. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est formé dans une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (Halliwell *et al.*, 2000 ; Halliwell et Gutteridge, 2015).



### II.2.2. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) est le plus réactif des radicaux libres. Il réagit fortement avec les molécules organiques et inorganiques, y compris les biomolécules, ce qui cause de graves dommages aux cellules. Il est formé lors de la réaction de Fenton, dans laquelle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagit avec des ions métalliques, souvent liés en complexe avec différentes protéines telles que la ferritine (Birben *et al.*, 2012 ; Phaniendra *et al.*, 2015).

Il est également formé par la réaction entre le radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans une réaction appelée réaction de Haber Weiss (Fenton, 1894 : Harber et Weiss, 1934).



### II.2.3. Monoxyde d'azote

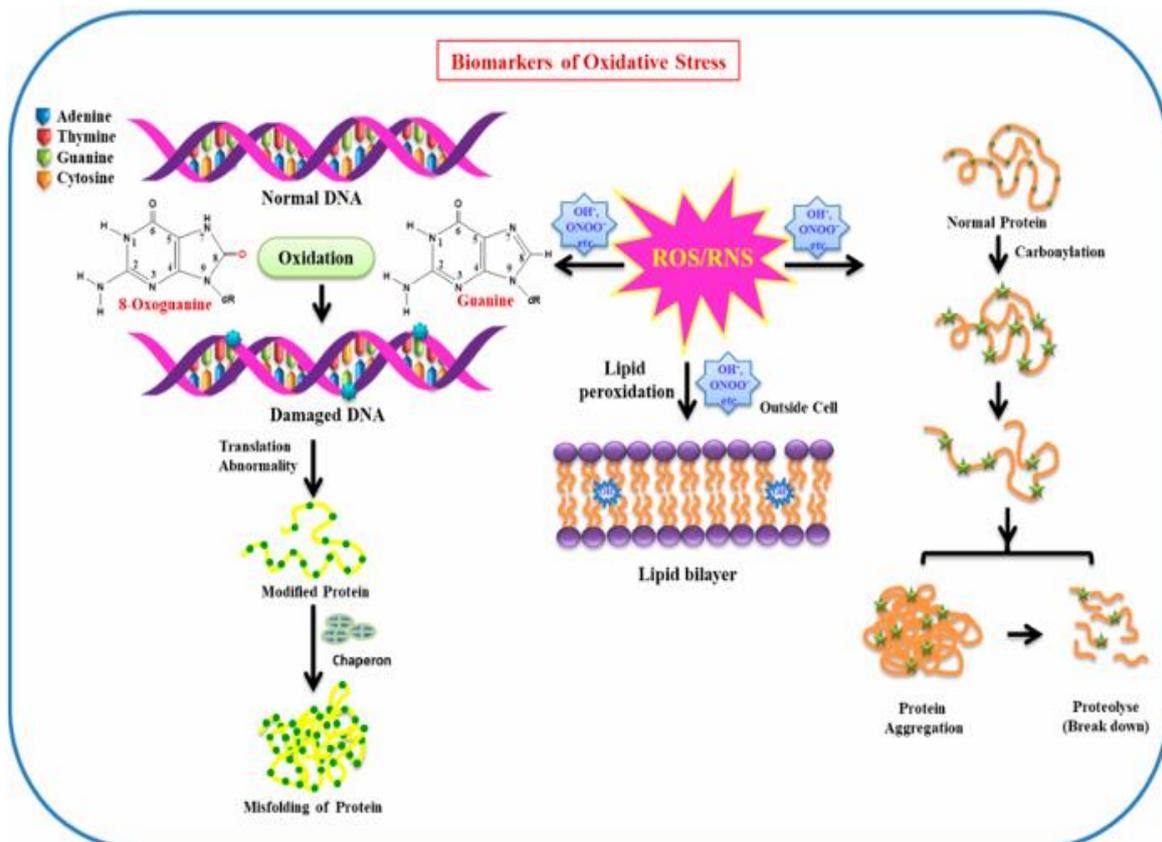
C'est une petite molécule générée dans les tissus par différentes enzymes appelées monoxyde d'azote synthases (NOS) qui convertissent la L-arginine en L-citrulline (Andrew et Mayer, 1999).



Il est à la fois soluble dans l'eau et dans les lipides et diffuse facilement à travers le cytoplasme et la membrane plasmique. Le  $\text{NO}^\bullet$  est un second messenger intracellulaire important qui stimule la guanylate cyclase (GC) et les protéines kinases et contribue à la relaxation des muscles lisses dans les vaisseaux sanguins (Ignarro *et al.*, 1987 ; Chiueh, 1999).

### II.3. Dommages oxydatifs des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent avoir des actions délétères sur les lipides, les protéines et l'ADN, lorsqu'ils sont présents en grandes quantités dans l'organisme (Figure 03).



**Figure 03 :** Effet des ERO/ERA sur les biomolécules (Singh *et al.*, 2019).

### II.3.1. Lipides

Les lipides membranaires tels que les acides gras polyinsaturés (AGPI), les lipides circulants (lipoprotéines) et le cholestérol non-estérifié (libre) sont les cibles principales de la peroxydation lipidique. Les produits métaboliques réactifs résultant de la peroxydation lipidique sont classés en métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires incluent les radicaux libres peroxydes ( $\text{ROO}^\bullet$ ), les hydroperoxydes organiques (HOOR) et les radicaux alcoxydes ( $\text{RO}^\bullet$ ). Les métabolites secondaires comprennent des aldéhydes tels que le 4-hydroxynonéal (4-HNE), reconnu comme le plus génotoxique, et le malondialdéhyde (MDA), connu pour ses propriétés mutagènes et athérogènes. Les dommages causés par la peroxydation lipidique atteignent la fluidité et la perméabilité membranaires. Ils engendrent également un changement de la structure des lipoprotéines et une perturbation du fonctionnement cellulaire (Yin *et al.*, 2011 ; Bensakhria, 2018).

### II.3.2. Protéines

Ce type de dommages cible les acides aminés soufrés et aromatiques en raison de leur sensibilité accrue à ces attaques, attribuable à la présence abondante de groupements sulfhydryles (SH) dans leurs structures. Ce mécanisme peut se produire directement sur les chaînes peptidiques et les groupes latéraux, générant des métabolites primaires. Il peut également être indirect, impliquant la glycation et la formation de groupements carbonyles, ou par la lipoxydation entraînant la formation de bases de Schiff ( $\text{R-NH}_2 + \text{R}'\text{-CHO} \rightarrow \text{R-CH=N-R}' + \text{H}_2\text{O}$ ) et d'adduits de Michael ( $\text{R-CH=CH-COOR}' + \text{R}'\text{-SH} \rightarrow \text{R-CH(SR}')\text{-CH}_2\text{-COOR}'$ ), qui sont des métabolites secondaires (Haleng *et al.*, 2007).

Les dommages oxydatifs des protéines entraînent des modifications structurelles majeures, lesquelles sont responsables de diverses perturbations des fonctions cellulaires, telles que des inhibitions enzymatiques, une perte de spécificité ligand-récepteur, des perturbations métaboliques ainsi que la formation de produits de glycation (PGA ou AGE - Advanced Glycation End products) (Haleng *et al.*, 2007 ; Bensakhria, 2018).

### II.3.3. Acide Désoxyribonucléique

Les dommages oxydatifs de l'ADN ciblent à la fois l'ADN mitochondrial et nucléaire. L'interaction du radical  $\text{OH}^\bullet$  avec l'ADN peut induire divers processus, notamment la formation d'adduits sur l'ADN, l'oxydation des bases et des résidus de sucres, des cassures de chaîne par capture d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose ainsi que la formation de sites abasiques. Les conséquences de ces altérations sont une altération de la fonction mitochondriale, la

formation d'espèces mutagènes, ainsi que l'activation des systèmes de réparation (Bensakhria, 2018 ; Baudin, 2020).

### II.4. Antioxydants

La formation de radicaux libres dans l'organisme vivant est contrôlée naturellement par plusieurs composants bénéfiques connus sous le nom d'antioxydants. Les antioxydants sont des substances qui ont la capacité de neutraliser les radicaux libres et d'inhiber les réactions d'oxydation. C'est lorsque la disponibilité de ses substances devient limitée que les dommages oxydants peuvent devenir significatifs, ce qui les rend indispensables au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il existe des antioxydants de sources endogènes et d'autres exogènes (Percival, 1998 ; Ozougwu, 2016) :

#### II.4.1. Sources endogènes

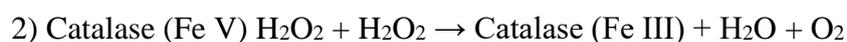
L'homme dispose d'un large spectre d'antioxydants qui sont soit enzymatiques ou non-enzymatiques (Birben *et al.*, 2012).

##### II.4.1.1. Antioxydants enzymatiques

- Superoxyde dismutase (SOD) : métalloenzyme ubiquitaire responsable de l'élimination de l'anion superoxyde par dismutation selon la réaction (1). Cette réaction a pour conséquences la réduction de la disponibilité  $O_2^{\bullet-}$ , limitation de la cascade radicalaire ( $OH^{\bullet}$ ,  $ONOO^{\bullet}$ ). Le  $H_2O_2$  est pris en charge par des enzymes de relai.



- Catalase (CAT) : enzyme héminique ubiquitaire retrouvée dans les globules rouges. Elle élimine  $H_2O_2$  par dismutation en deux étapes (Percival, 1998 ; Bensakhria, 2018) :



- Système Glutathion peroxydase/Glutathion réductase (GPx/GR) : sélénoprotéine ubiquitaire (7 isoformes) capable d'éliminer 70% des peroxydes organiques et 94% de  $H_2O_2$  par réduction selon les réactions suivantes (Percival, 1998 ; Bensakhria, 2018) :



### II.4.1.2. Antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont des molécules qui désactivent les radicaux libres dans le sang. Ils comprennent le glutathion (GSH), la coenzyme Q10, l'albumine, l'acide urique et l'acide ascorbique (vitamine C). Contrairement aux antioxydants enzymatiques, ces antioxydants ne nécessitent pas de cofacteurs pour exercer leur activité (Wu *et al.*, 2013).

### II.4.2. Source exogène (alimentaire) :

En termes d'apport alimentaire, les fruits et les légumes sont la principale source d'antioxydants. Ils sont particulièrement riches en vitamines (A, C et E), en  $\beta$ -carotènes et autres caroténoïdes, ainsi qu'en polyphénols et en flavonoïdes. D'autres aliments tels que les huiles végétales contiennent de la vitamine E, tandis que les produits laitiers sont des sources de vitamine A. Les minéraux et oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc sont des cofacteurs nécessaires aux enzymes antioxydantes (Percival, 1998 ; Haleng *et al.*, 2007).

## III. Les polyphénols

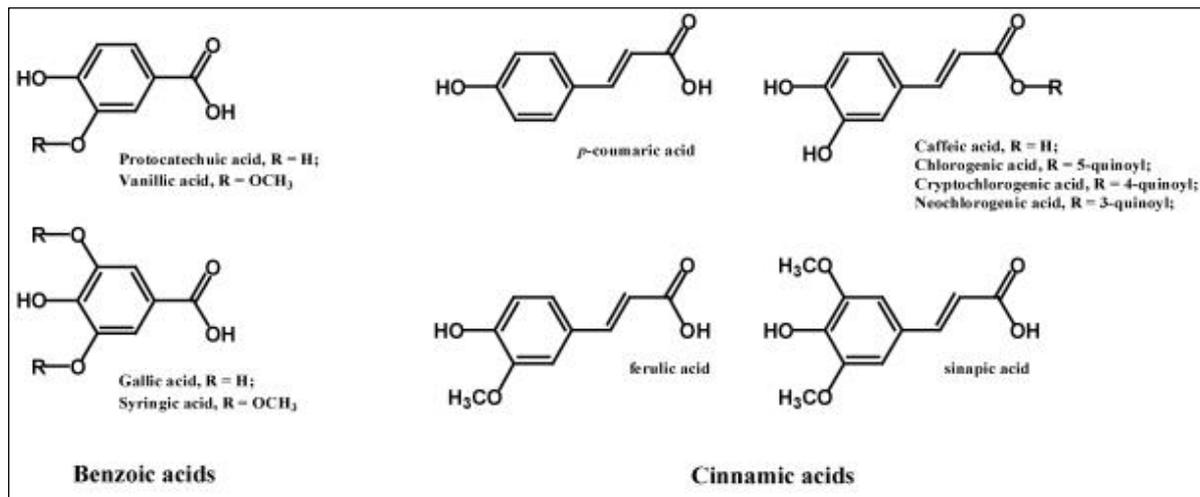
Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par différents organismes vivants. Ils forment une grande famille de molécules organiques retrouvées notamment dans le règne végétal (Harborne et Williams, 2000 ; Cutrim et Cortez, 2018). Les polyphénols sont impliqués dans l'attraction des pollinisateurs, l'exécution de fonctions structurelles, la défense contre les rayons ultraviolets et la protection contre les invasions microbiennes et les herbivores. Ils sont principalement contenus dans les aliments tels que les fruits et légumes. De plus, la teneur des végétaux en composés phénoliques est responsable de leurs qualités sensorielles comme l'astringence, la couleur et l'odeur (Pandey et Rizvi, 2009 ; Cutrim et Cortez, 2018).

### III.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont des composés naturels de structures chimiques diverses, caractérisées par la présence d'au moins deux anneaux phénols et d'un ou de plusieurs groupements hydroxyles (OH). Ils sont dérivés soit directement de la phénylalanine, soit d'un précurseur appelé, l'acide shikimique (Pandey et Rizvi, 2009 ; Hanhineva *et al.*, 2010). Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes, notamment les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins. Ces composés peuvent exister sous forme non conjuguée (aglycone) ou conjuguée avec du glucose, des acides organiques, des acides carboxyliques, des amines ou des lipides. Environ 8 000 composés polyphénoliques sont connus, dont plus de 4 000 flavonoïdes (Pandey et Rizvi, 2009 ; Abbas *et al.*, 2017 ; Dias *et al.*, 2021).

### III. 1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont une classe de polyphénols non flavonoïdes caractérisés par la présence de plusieurs groupes OH sur des anneaux aromatiques (Figure 04). D'après Tsao (2010), ils se distinguent par deux structures de base ; l'acide benzoïque, composé de sept atomes de carbone (C6-C1) et l'acide cinnamique, composé de neuf atomes de carbone (C3-C6). Les dérivés de l'acide benzoïque sont l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide ellagique. Tandis que les dérivés de l'acide cinnamique sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique (Tsao, 2010 ; Cutrim et Cortez, 2018).



**Figure 04 :** Structures chimiques des différents acides phénoliques (Tsao, 2010).

### III.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le groupe de polyphénols le plus étudié. Ils possèdent une structure fondamentale composée de deux anneaux aromatiques reliés par trois atomes de carbone, formant ainsi un hétérocycle oxygéné (Figure 05), (Spencer *et al.*, 2008 ; Pandey et Rizvi, 2009). Sur la base de la variation structurelle des hétérocycles, les flavonoïdes peuvent être divisés en six sous-classes : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols, les anthocyanines et les isoflavones. Les différences au sein de chaque sous-classe sont dues à des variations dans le nombre et la disposition des groupes hydroxyles, ainsi que dans leur degré d'alkylation et de glycosylation. Les flavonoïdes les plus connus sont la quercétine, la catéchine, la naringénine et la cyanidine-glycoside (Archivio *et al.*, 2007 ; Abbas *et al.*, 2017).

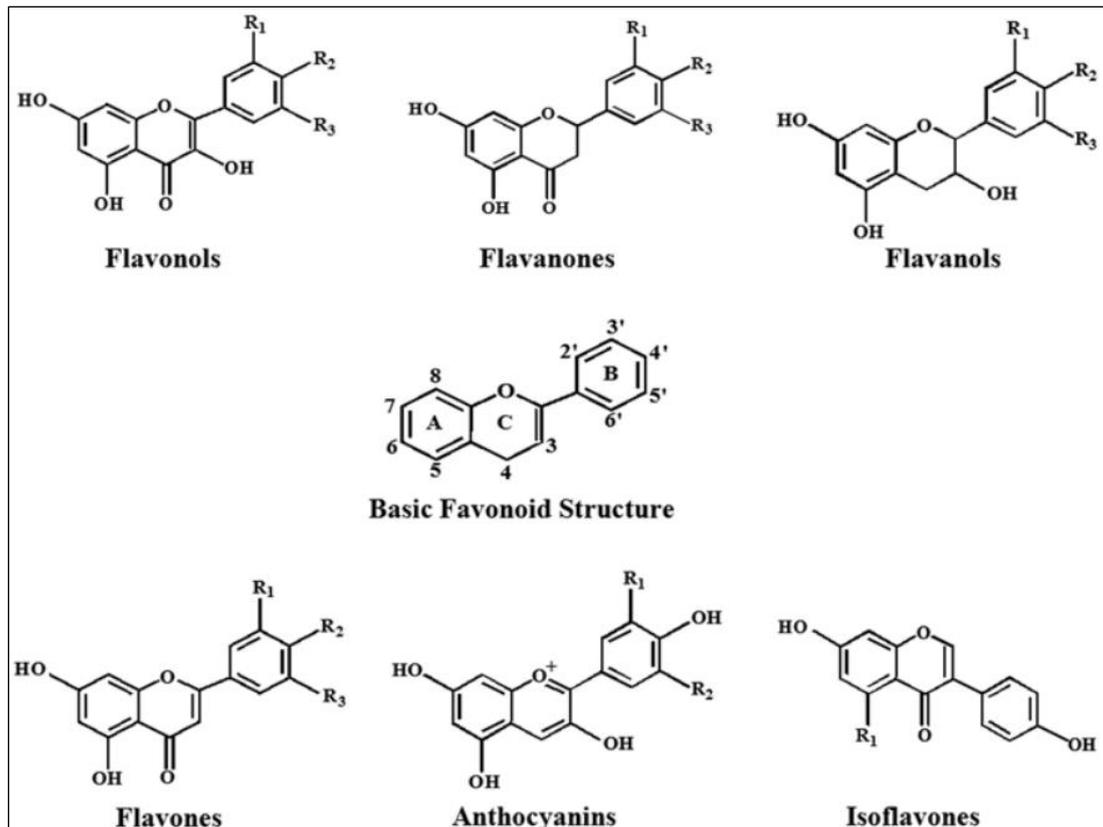
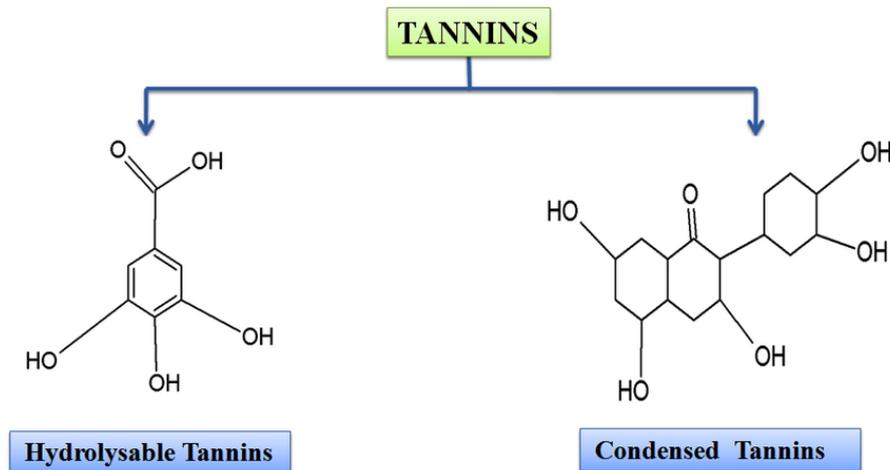


Figure 05 : Structures chimiques et sous-classes des flavonoïdes (Pandey et Rizvi, 2009).

### III.1.3. Tanins

Les tanins sont un groupe hétérogène naturel de substances phénoliques hydrosolubles de poids moléculaire élevé chez les végétaux. Leurs compositions chimiques incluent des cycles phénoliques et des groupements hydroxyles, ce qui leur confère des caractéristiques antioxydantes. Ils sont divisés en deux classes importantes ; les tanins hydrolysables et tanins condensés. Les tanins hydrolysables sont subdivisés en gallotannins ; l'hydrolyse produit du sucre et de l'acide gallique. Et en ellagitanins ; l'hydrolyse produit du sucre, de l'acide gallique et de l'acide ellagique (Lamy *et al.*, 2016, Vuolo *et al.*, 2019).



### III.2. Propriétés biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont connus pour avoir des effets bénéfiques sur la santé grâce à leurs propriétés antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, antihypertensive et anticancéreuse (Cutrim et Cortez, 2018).

#### III.2.1. Activité antioxydante

Les polyphénols sont considérés comme les antioxydants naturels les plus importants contenus dans l'alimentation humaine. Ils ont la capacité de convertir les radicaux libres en d'autres espèces plus stables, ainsi que de réguler la signalisation cellulaire redox-dépendante dans les organismes vivants. Cette capacité antioxydante des composés phénoliques est due à leur structure et à la position et au nombre de leurs groupes hydroxyles (OH). Ceci permet de neutraliser les radicaux libres (Yan *et al.*, 2020 ; Mihanfar *et al.*, 2021).

Les composés phénoliques ont également été distingués par leur capacité à chélater les métaux permettant de prévenir la dégradation de l'ADN au sein des cellules vivantes. Le mécanisme antioxydant réside dans leur capacité à piéger les ions métalliques tels que  $Fe^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ , qui pourraient participer à la réaction de Fenton en présence du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Li *et al.*, 2018). De plus, des travaux *in vivo* ont également révélé que ces substances phytochimiques peuvent augmenter les niveaux de superoxyde dismutase (SOD), de glutathion peroxydase (GSH-Px) et de catalase sérique (CAT), ce qui entraîne une réduction de la production de malondialdéhyde (MDA). Les polyphénols peuvent ainsi réguler les systèmes d'oxydoréductase, renforçant la capacité antioxydante des organismes (Yan *et al.*, 2020 ; Rathod *et al.*, 2023).

### III.2.2. Activité antimicrobienne

Les polyphénols ont acquis une importance particulière en raison de leur capacité à agir de manière diversifiée contre un large spectre de populations microbiennes (Othman *et al.*, 2019 ; López-Malo *et al.*, 2020). Ils sont capables de perturber la membrane lipidique grâce à leurs groupes hydroxyles (OH) qui interagissent avec la paroi cellulaire bactérienne. Cette perturbation entraîne des échanges de protons qui vont diminuer le gradient à travers la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes, d'où une acidification du cytoplasme, et une réduction de la production d'ATP aboutissant à une altération du fonctionnement intracellulaire conduisant à la mort des bactéries (Othman *et al.*, 2019 ; Bensid *et al.*, 2022).

### III.2.3. Activité anti-inflammatoire

Les polyphénols possèdent des propriétés anti-inflammatoires bien démontrées qui jouent un rôle dans la régulation des cellules immunitaires, des cytokines et des voies de signalisation. Ils exercent également une influence sur les cellules dendritiques qui vont initier la réponse immunitaire, ainsi que sur les lymphocytes B et T. De plus, ils inhibent l'activation des cellules tueuses naturelles (NK) et suppriment les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) (Yahfoufi *et al.*, 2018 ; de Carvalho *et al.*, 2020). Par ailleurs, les composés phénoliques peuvent moduler la fonction immunitaire par différents mécanismes, notamment par l'inhibition de la production des molécules pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, iNOS), et l'induction de signaux Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), impliqués dans la protection contre le stress oxydant (Singh *et al.*, 2020 ; Nani *et al.*, 2021).

### III.2.4. Activité anticancéreuse

Les polyphénols, grâce à leur diversité structurelle importante, sont capables d'engendrer une multitude de propriétés biologiques, notamment dans la lutte contre le cancer. Des études épidémiologiques, précliniques et cliniques ont démontré un lien étroit entre la consommation quotidienne d'aliments riches en polyphénols et la prévention de divers types de cancers (Lewandowska *et al.*, 2016 ; Yi *et al.*, 2019).

Les polyphénols peuvent exercer leurs effets anticancéreux en régulant de nombreuses voies de signalisation cellulaire telles que la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et PI3K (phosphoinositide 3-kinase) ; qui stimulent la prolifération cellulaire. Les propriétés anticancéreuses et cytoprotectrices démontrées sont principalement attribuées à leurs activités anti-inflammatoires, anti-prolifératives, anti-angiogéniques et anti-métastatiques (Sajadimajd *et al.*, 2020 ; Patra *et al.*, 2021). Les composés phénoliques peuvent également interrompre la

réplication de l'ADN, la transcription de l'ARNm et participer à la réparation des dommages de l'ADN des cellules cancéreuses (Majidinia *et al.*, 2019 ; Mancini *et al.*, 2023).

### III.2.5. Interaction des polyphénols avec le microbiote intestinal

Les interactions potentielles entre les polyphénols et le microbiote intestinal suscitent un intérêt grandissant. Les métabolites des polyphénols pourraient stimuler la croissance et la formation de la famille des bactéries probiotiques telles que les Bifidobacteriaceae et les Lactobacillaceae et inhiber les bactéries pathogènes telles que *E. coli*, *Clostridium perfringens*, et *Helicobacter pylori* (Laparra et Sanz, 2010 ; Marín *et al.*, 2015). Ces interactions pourraient également réduire sensiblement le risque de maladies chroniques, telles que la résistance à l'insuline et l'athérosclérose (Del Rio *et al.*, 2013 ; Zanotti *et al.*, 2015).

### III.3. Méthodes d'extraction des polyphénols

Les techniques d'extraction des polyphénols varient considérablement, allant des méthodes conventionnelles telles que la macération et l'extraction par Soxhlet, aux approches non conventionnelles comme l'utilisation des ultrasons et des microondes, chacune offrant des avantages spécifiques en termes d'efficacité et de rendement (Routray et Orsat, 2012 ; Rostagno et Prado, 2013 ; Chemat *et al.*, 2017).

#### III.3.1. Méthodes conventionnelles

- **Infusion**

L'infusion est un processus simple utilisé pour extraire des matières végétales volatiles qui se dissolvent ou qui libèrent facilement leurs principes actifs dans de l'eau bouillante dans un récipient hermétique pendant environ 15 minutes. Ensuite, l'extrait est filtré pour séparer les résidus solides. Le matériel végétal peut également être réduit en poudre fine, placé dans un récipient en verre, et un solvant d'extraction chaud est appliqué sur le matériel pendant quelques minutes. Cette méthode est particulièrement efficace pour obtenir des métabolites secondaires facilement solubles (Azwanida, 2015 ; Kamil *et al.*, 2019).

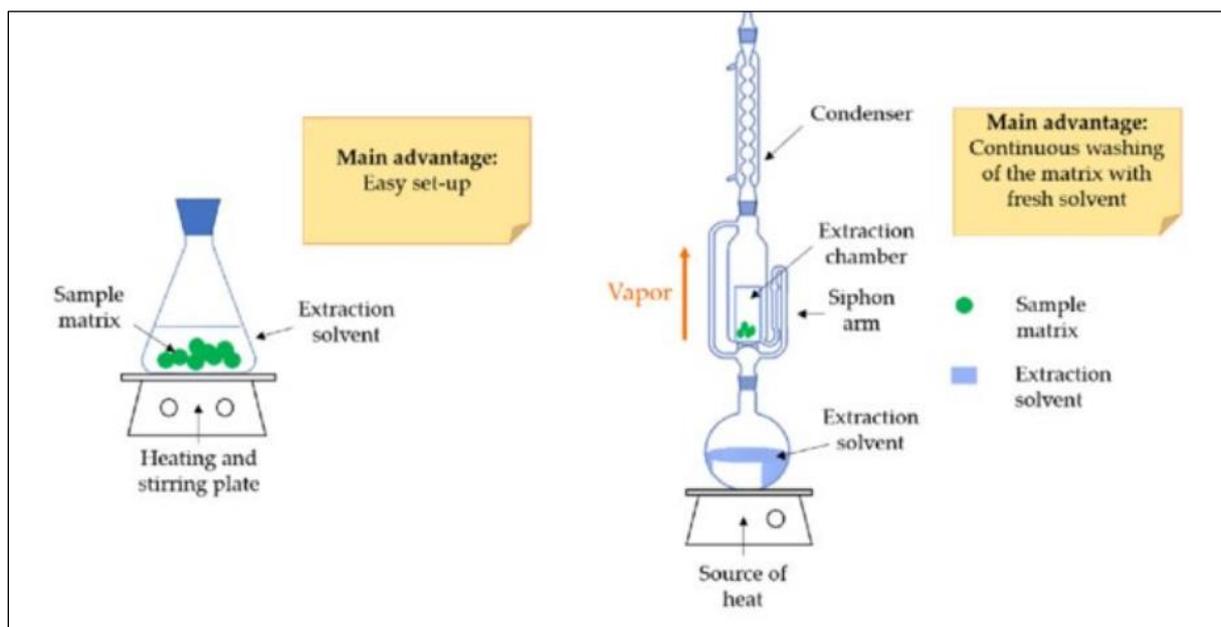
- **Macération**

La macération est un processus très ancien au cours duquel des matières végétales entières ou préalablement broyées sont trempées dans un solvant approprié, pendant une durée déterminée (quelques heures à quelques jours), souvent à température ambiante (Figure 06). Cette méthode est régulièrement réalisée sous agitation afin de permettre une bonne dissolution des matières végétales. Le macérât obtenu est filtré et les filtrats sont enfin combinés. La

macération est particulièrement utile pour l'extraction de composés bioactifs, notamment sensibles à la chaleur (Li *et al.*, 2007 ; Mosaic *et al.*, 2020 ; Frosi *et al.*, 2021).

- **Extraction Soxhlet**

L'extraction Soxhlet est un procédé d'extraction continue des substances phytochimiques à partir de végétaux en utilisant un solvant chaud (Figure 06). Le matériau végétal broyé est placé dans une cartouche en papier filtre solide ou en cellulose. Ce dernier contenant le matériau est inséré dans le compartiment dédié de l'appareil Soxhlet. Le solvant d'extraction est versé dans le récipient (ballon) inférieur. Le solvant est chauffé, puis la vapeur est condensée dans le condensateur et retombée dans la cartouche contenant l'échantillon, placée au-dessus de l'appareil. L'extraction des polyphénols est réalisée pendant quelques heures jusqu'à saturation. Cette méthode permet une extraction efficace avec un rendement supérieur à celui obtenu par macération (Azwanida, 2015 ; Alara *et al.*, 2018 ; Frosi *et al.*, 2021).



**Figure 06 :** Représentation schématique des méthodes d'extraction conventionnelles par macération et Soxhlet (Frosi *et al.*, 2021).

### III.3.2. Méthodes non-conventionnelles

- **Extraction assistée par micro-ondes (MAE)**

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) est une méthode qui utilise l'énergie des micro-ondes pour chauffer les solvants en contact avec les particules d'une matrice végétale, pour

faciliter la migration des composés actifs de la matrice vers le solvant (Eskilsson *et al.*, 2000). Cette méthode utilise un applicateur à micro-ondes comme source d'énergie, permettant 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 (Huang *et al.*, 2017 ; Çavdar *et al.*, 2017).

- **Extraction assistée par ultrasons (UAE)**

La méthode d'extraction assistée par ultrasons (UAE) est une technique qui exploite l'effet mécanique de l'implosion de bulles microscopiques pour induire une désorganisation rapide des tissus végétaux. Cela facilite la diffusion des composés phytochimiques de la matrice vers le solvant. Le système d'extraction par ultrasons comprend un générateur de puissance, un transducteur, un amplificateur et une sonde. Le transducteur convertit l'énergie électrique en énergie acoustique en vibrant mécaniquement à des fréquences ultrasonores. La matrice biologique est placée dans un récipient d'extraction, le solvant est ajouté, et le processus ultrasonique est ensuite initié (Vinatoru, 2001 ; Osorio-Tobón *et al.*, 2020).

# **Partie expérimentale**

# **Matériel et méthodes**

## I. Matériel et méthodes

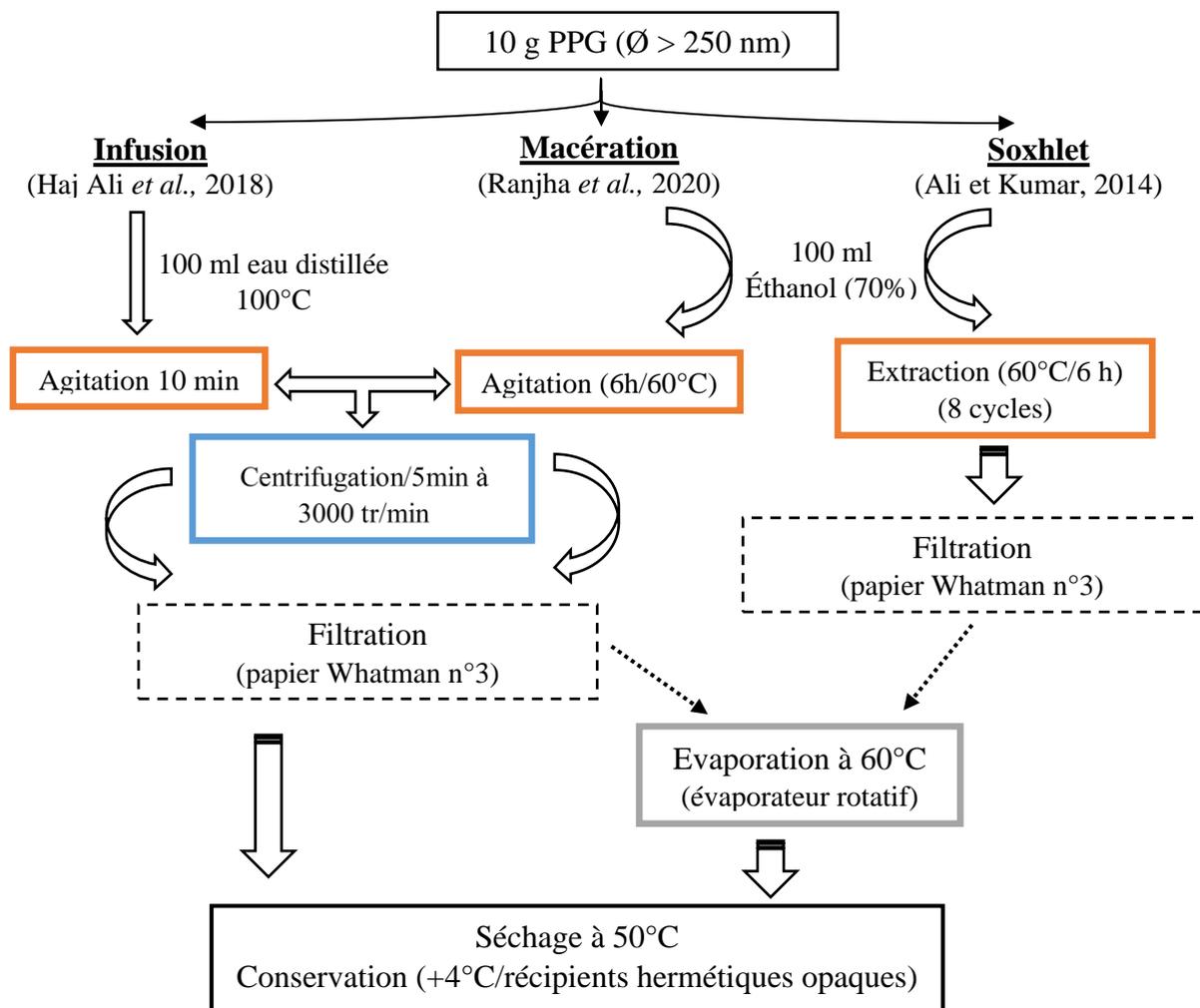
### I.1. Matériel

L'étude est réalisée sur des extraits de pelure de grenade « *Punica granatum* ». Le fruit provient des commerces de la ville de Béjaia, dans la période d'octobre à novembre 2022.

### I.2. Méthodes

#### I.2.1. Préparation des extraits

Les pelures de grenade ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant quelques semaines. Les pelures séchées ont été ensuite broyées en poudre fine puis tamisée à l'aide d'un tamiseur électrique ( $<250 \mu\text{m}$ ). L'extraction a été réalisée à partir de la poudre par trois méthodes conventionnelles ; infusion, macération et Soxhlet (Figure 7).



**Figure 07** : Représentation schématique des trois méthodes d'extraction (Selon Ait Otmane et Ait Souki, 2022).

### I.2.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux contenus dans les trois extraits de la pelure de grenade a été estimé par la méthode au réactif du Folin-Ciocalteu (Georgé *et al.*, 2005).

Un volume de 500 µl de Folin-Ciocalteu (1:10) est ajouté à 100 µl des extraits de la pelure de grenade (0.3, 0.5 et 1 mg/ml). Après 4 minutes d'incubation à température ambiante, 400 µl d'une solution de carbonate de sodium (7.5%) sont ajoutés au milieu réactionnel. Les tubes sont agités au vortex puis incubés au bain-Marie à 50°C pendant 15 minutes. Une coloration bleue est observée à la fin de l'incubation. Les tubes sont refroidis dans de la glace puis l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à  $\lambda=760$  nm.

Tous les échantillons ont été réalisés en triplicate. La teneur en polyphénols totaux a été estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard (0-200 µg/ml). Elle est exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

### I.2.3. Analyse de l'activité scavenger de radicaux libres

#### I.2.3.1. Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

L'évaluation de l'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les trois extraits de pelure de grenade a été mesurée par la méthode de Mukhopadhyay *et al.* (2016), avec quelques modifications.

Un volume (750 µl) de chacun des extraits étudiés est ajouté à 125 µl de FeSO<sub>4</sub> (1 mM). Après agitation au vortex, le mélange de chaque tube est additionné de 32 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM). L'ensemble des tubes est incubé pendant 5 min à température ambiante et à l'obscurité. Ensuite, 750 µl de phénanthroline (1 mM) sont ajoutés au mélange et incubés 10 min à température ambiante à l'obscurité. Une couleur rouge-orangée apparaît. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à  $\lambda = 510$  nm.

Afin de calculer le pourcentage d'activité scavenger du radical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un contrôle contenant du FeSO<sub>4</sub> et de la phénanthroline dont la couleur est rouge-orangée a été préparé, ainsi qu'un blanc échantillon contenant l'extrait et du FeSO<sub>4</sub>. Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du radical hydroxyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les différents extraits analysés a été calculé selon l'équation :

$$\% \text{ Activité scavenger du radical H}_2\text{O}_2 = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100.$$

A<sub>0</sub> : absorbance du contrôle (sans extrait).

A<sub>t</sub> : absorbance du test (avec extrait).

### I.2.3.2. Activité scavenger du radical hydroxyle (OH•)

L'activité scavenger du radical OH• par les trois extraits de pelure de grenade a été mesurée par la méthode de Rajamanikandan *et al.* (2011).

500µl de chaque extrait de pelure de grenade dissout dans de l'eau distillée ont été additionnés à 500 µL de FeSO<sub>4</sub> (1.5 Mm) plus 350 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 Mm) et 150 µL de salicylate de sodium (20 Mm). Après agitation au vortex, les échantillons ont été incubés pendant 1 h dans un bain-Marie à 37°C. Ensuite, les échantillons troubles ont été centrifugés à 10 000 tours/min pendant 5 min. L'absorbance correspondant à la formation du complexe salicylate hydroxylé a été mesurée à  $\lambda = 562$  nm. Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du radical OH par les différents extraits analysés a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité scavenger du radical OH}^\bullet = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100.$$

A<sub>0</sub> : Absorbance du contrôle (sans extrait)

A<sub>t</sub> : absorbance du test (avec extrait).

### I.2.3.3. Activité scavenger du radical monoxyde d'azote (NO•)

L'activité antioxydante des trois extraits de pelure de grenade par le piégeage du radical NO• a été évaluée par la méthode de Griess (Awah et Verla, 2010).

Un volume de 500 µl de l'extrait est ajouté à 500 µl de nitroprussiate de sodium (NPS, 5 Mm) préparé dans du tampon phosphate salin (PBS, pH = 7.4). Après vortex, les tubes sont incubés sous la lumière d'une lampe électrique, à température ambiante pendant 1h 30. Ensuite, 500 µl du réactif de sulfanilamide (1% dans 5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) sont rajoutés, puis incubés pendant 10 min à l'obscurité. Après, 500 µl de dichlorhydrate de naphtyléthylène diamine (NEDD, 0.1%) sont ajoutés dans chaque tube puis incubés pendant 20 min à température ambiante et à l'obscurité. À la fin, une couleur rose est obtenue et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à  $\lambda=543$  nm. Le pourcentage du potentiel neutralisant le NO• par les extraits de pelure de grenade a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité scavenger du radical NO}^\bullet = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100.$$

A<sub>0</sub> : absorbance du contrôle (sans extrait).

A<sub>t</sub> : absorbance du test (avec extrait).

### I.2.4. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de la moyenne  $\pm$  écart-type (N = 3). L'analyse statistique est réalisée par le logiciel GraphPad Prism 5 en appliquant l'analyse de la variance (ANOVA). Une valeur de  $p < 0.05$  a été considérée comme étant statistiquement significative.

## **Résultats et discussion**

## II. Résultats et discussion

La présente étude a été réalisée sur des extraits de pelure de grenade obtenus par trois techniques d'extraction différentes ; infusion (EI), macération (EM) et Soxhlet (ES). Le contenu en polyphénols totaux de chacun de ces extraits a été évalué. L'activité antioxydante par neutralisation du radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ), du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ainsi que du monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ) a été également déterminée.

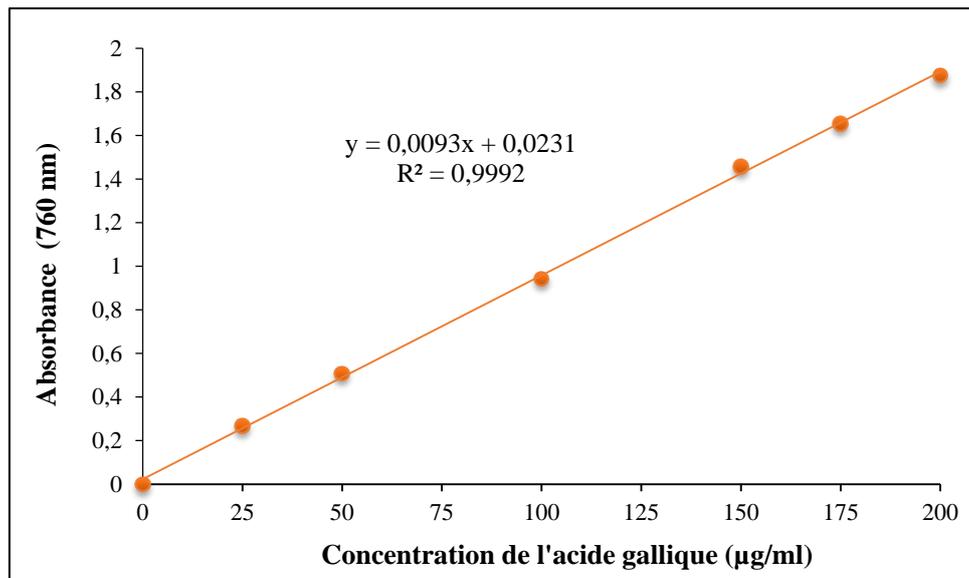
### II.1. Contenu en polyphénols totaux

Les polyphénols sont des composés naturels synthétisés principalement par les plantes, dont les caractéristiques chimiques leur confèrent de puissantes propriétés antioxydantes (Singh *et al.*, 2019).

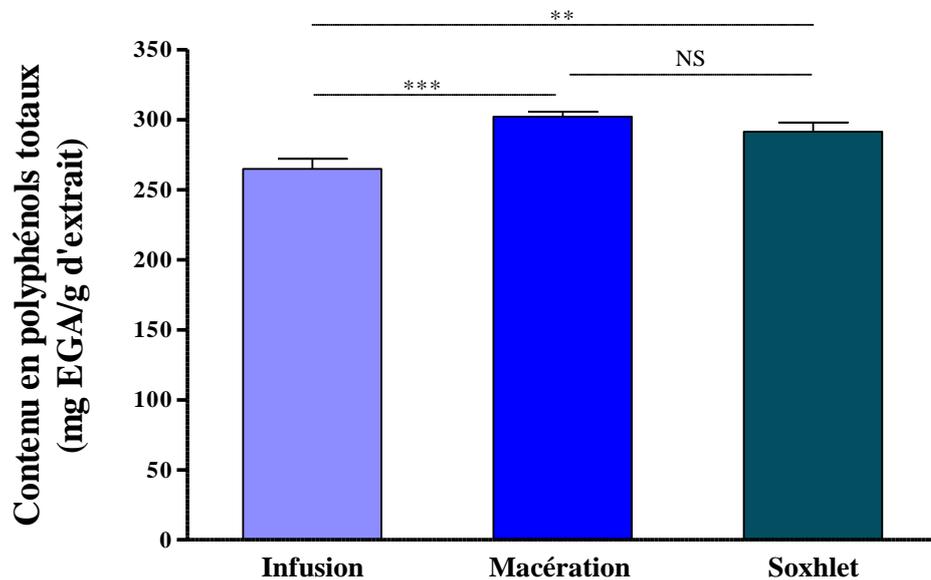
La teneur en polyphénols totaux (TPC) a été déterminée par la méthode du Folin-Ciocalteu selon la Georgé *et al.* (2005). Le principe de cette réaction repose sur la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu, qui est un mélange d'acides phosphotungstiques ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et phosphomolybdiques ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), en oxydes bleus de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) lors de l'oxydation des groupements phénols. Cette réaction est réalisée en présence de carbonates de sodium ( $\text{NaCO}_3$ ) et donne une coloration bleue proportionnelle à la quantité de polyphénols analysée à 760 nm (Georgé *et al.*, 2005).

Une gamme étalon de concentrations de 0-200  $\mu\text{g/ml}$  d'acide gallique (standard) a été réalisée afin de déterminer les teneurs en polyphénols des extraits analysés. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g), à partir de l'équation de régression linéaire de la droite d'étalonnage (Figure 08).

Le dosage des polyphénols dans les trois extraits étudiés (infusion, macération et Soxhlet) a permis d'obtenir les résultats présentés dans la figure 09.



**Figure 08 :** Droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de différentes concentrations de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.



**Figure 09 :** Contenu en polyphénols totaux dans les extraits obtenus par les trois méthodes d'extraction (NS : non significatif ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

La teneur en polyphénols totaux la plus élevée a été obtenue dans les deux extraits de macération ( $302.05 \pm 3.51$  mg EAG/g) et Soxhlet ( $291.29 \pm 6.51$  mg EAG/g). Tandis que la valeur obtenue dans l'extrait d'infusion ( $264.69 \pm 7.28$  mg EAG/g) est significativement inférieure à celle obtenue par macération ( $p < 0.001$ ) et par Soxhlet ( $p < 0.01$ ).

Cette différence pourrait être due à différents facteurs influençant l'extraction des polyphénols tels que le solvant, la méthode, la température et le temps d'extraction (Tamborlin *et al.*, 2020 ; Anila et Mohammed, 2022).

A des températures élevées, une dégradation des polyphénols peut se produire. Ceci pourrait expliquer la diminution de la teneur en polyphénols dans l'extrait de l'infusion. Néanmoins, il a été montré qu'une augmentation des TPC pourrait être obtenue à des températures élevées, probablement due à la rupture des liaisons lignine-acide phénoliques ou à la décomposition de la lignine elle-même, donnant lieu à une plus grande quantité d'acide phénolique (Anila et Mohammed, 2022).

En effet, les composés phénoliques polaires sont extraits à basse température tandis que les composés phénoliques moins polaires sont extraits à des températures plus élevées. De plus, la polarité de l'eau est réduite à des températures plus élevées, ce qui lui permet de solvater les composés non polaires. Par conséquent, les composés phénoliques peuvent être extraits en fonction de la température d'extraction avec une grande sélectivité (Ibañez *et al.*, 2003).

Par ailleurs, les solvants mixtes se sont montrés particulièrement efficaces. En effet, le méthanol (70%), l'éthanol (70%) et l'acétone (70%) permettent d'obtenir des teneurs plus élevées en TPC, suivis par les solvants purs et aqueux (Bourgou *et al.*, 2016).

Le solvant utilisé pour la macération et l'extraction au Soxhlet est l'éthanol 70%, qui est un solvant mixte. Celui-ci semble être plus efficace que l'eau dans l'extraction des polyphénols probablement par l'augmentation de leur solubilité (Bourgou *et al.*, 2016). Comparativement à l'infusion, la macération et le Soxhlet nécessitent une durée d'extraction plus longue. Cette prolongation permet un contact prolongé entre la poudre et le solvant, ce qui favorise la rupture des parois cellulaires et libère davantage de polyphénols (Turkmen *et al.*, 2009 ; Rhazi *et al.*, 2015 ; Yanchev *et al.*, 2022).

Les résultats montrent que les méthodes d'extraction influencent significativement la teneur en polyphénols des extraits de pelure de grenade étudiés. Les techniques de macération et

d'extraction au Soxhlet, utilisant un solvant mixte (éthanol 70%), ont produit les concentrations les plus élevées en polyphénols totaux.

## II.2. Evaluation du pouvoir scavenger des radicaux libres

### II.2.1. Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est une espèce réactive non radicalaire capable de causer des dommages aux biomolécules *via* différents mécanismes, notamment en présence du fer. Il se décompose en radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ), le plus instable des radicaux libres (Halliwell *et al.*, 2000 ; Tiago *et al.*, 2021).

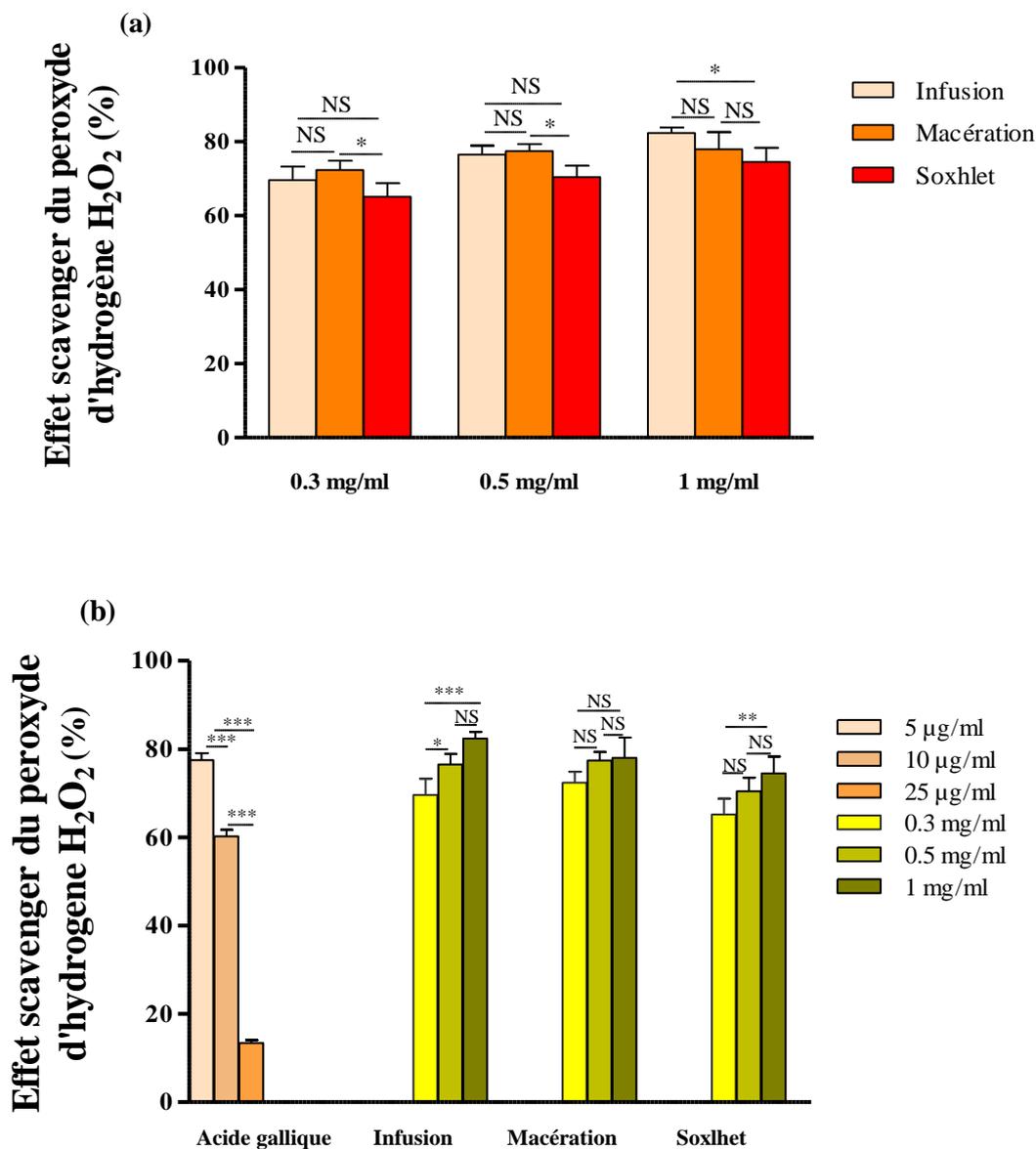
La capacité des extraits de pelure de grenade préparés par les différentes méthodes d'extraction (infusion, macération et Soxhlet) et aux concentrations croissantes (0.3, 0.5 et 1 mg/ml), à piéger le peroxyde d'hydrogène est estimée selon la méthode décrite par Mukhopadhyay *et al.* (2016).

Le principe de cette méthode est basé sur la réaction de l'ion ferreux  $Fe^{2+}$  avec trois molécules de phénantroline ; le complexe  $[fer-3Phénantroline]^{2+}$  formé donne une couleur orangée. En présence du  $H_2O_2$ , le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) est réduit en fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ), ainsi il n'y aura pas de formation du complexe  $[fer-3Phénantroline]^{2+}$ . En revanche, en présence d'un antioxydant ayant pour rôle de piéger le  $H_2O_2$ , le  $Fe^{2+}$  ne sera pas réduit et forme le complexe  $[fer-3Phénantroline]^{2+}$  (Mukhopadhyay *et al.*, 2016). L'acide gallique, un antioxydant de référence, est utilisé comme étalon (Figure 10b).

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits de la pelure de grenade (0.3, 0.5 et 1 mg/ml) ont un effet scavenger du  $H_2O_2$  de 65-82%. À une concentration de 0.3 mg/ml, l'EM et EI ont montré un taux d'inhibition de  $72.37 \pm 2,54\%$  et  $69.62 \pm 3.67\%$  respectivement. Une différence significative ( $p < 0.05$ ) a été notée entre EM et ES ( $65.15 \pm 3.63\%$ ). La même différence a été observée à une concentration de 0.5 mg/ml, où la capacité scavenger du  $H_2O_2$  a été de  $70.45 \pm 3.07\%$  pour ES,  $77.42 \pm 1,93\%$  pour EM et  $76.52 \pm 2.42\%$  pour EI. Par ailleurs, à 1 mg/ml, EI présente un taux d'inhibition de l'oxydation du  $H_2O_2$  de  $82.36 \pm 1.50\%$ . Cette valeur, est équivalente à celle obtenue par EM ( $77.99 \pm 4.63\%$ ). Tandis que la capacité neutralisant le  $H_2O_2$  par ES ( $74.50 \pm 3.83\%$ ) est significativement inférieure ( $p < 0.05$ ) à celle obtenue par infusion (Figure 10a).

Pour les trois concentrations analysées, la capacité à neutraliser  $H_2O_2$  par ES est inférieure à celle de EM ainsi que EI. Cela pourrait être dû à une dégradation partielle des polyphénols à cause de températures élevées pendant une période prolongée employée dans l'extraction

Soxhlet. Des polyphénols tels que les anthocyanes, qui sont thermolabiles, se dégradent à une vitesse qui augmente considérablement avec la température, affectant ainsi leur efficacité antioxydante (Aurelio *et al.*, 2008 ; Rudrapal *et al.*, 2024).



**Figure 10 :** Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par les trois extraits de pelure de grenade *Punica granatum* et l'acide gallique. (a) comparaison entre les extraits. (b) comparaison entre les différentes concentrations.

D'autre part, la comparaison de l'effet des différentes concentrations (0.3, 0.5 et 1 mg/ml) pour chacun des extraits analysés, n'a révélé aucune différence significative pour EI à 0.5 et 1 mg/ml ( $76.52 \pm 2.42$  % ;  $82.36 \pm 1.50$ %, respectivement). Cependant ces valeurs sont

significativement élevées ( $p < 0.001$ ) par rapport à celle obtenue à 0.3 mg/ml ( $69.62 \pm 3.65\%$ ). Pour EM, aucune différence significative n'a été observée entre les trois différentes concentrations avec des taux d'inhibition de  $72.37 \pm 2.54$ ,  $77.42 \pm 1.93$  et  $77.99 \pm 4.63\%$ , respectivement. Enfin pour ES, le taux d'inhibition de l'oxydation du  $H_2O_2$  n'a montré aucune différence significative entre les concentrations 1 mg/ml ( $74.50 \pm 3.83\%$ ) et 0.5 mg/ml ( $70.45 \pm 3.07\%$ ). Celle-ci a été aussi équivalente à celle obtenue à 0.3 mg/ml ( $65.15 \pm 3.63\%$ ), significativement inférieure ( $p < 0.01$ ) au potentiel exercé par EM (Figure 10b).

Les résultats de l'activité scavenger du  $H_2O_2$  exercée par le standard (acide gallique) à concentrations croissantes (5, 10 et 25  $\mu\text{g/ml}$ ) sont illustrés dans la figure 10b. A 5  $\mu\text{g/ml}$ , l'acide gallique montre un taux d'inhibition de l'oxydation du  $H_2O_2$  de  $77.48 \pm 1.63\%$ , significativement élevé ( $p < 0.001$ ) par rapport à 10 et 25  $\mu\text{g/ml}$ . De plus, l'acide gallique à 10  $\mu\text{g/ml}$  a montré une activité inhibitrice de  $60.23 \pm 1.52\%$ , significativement élevée ( $p < 0.001$ ) par rapport à l'effet scavenger induit à 25  $\mu\text{g/ml}$  ( $13.39 \pm 0.69\%$ ).

Le pouvoir des extraits de la pelure de grenade EI, EM et ES aux différentes concentrations (0.3, 0.5 et 1 mg/ml) à neutraliser le peroxyde d'hydrogène serait dû à la capacité structurelle des extraits à céder un atome d'hydrogène pour réduire le  $H_2O_2$  en deux molécules de  $H_2O$ . Les polyphénols, notamment les flavonoïdes, sont bien étudiés pour leurs propriétés antioxydantes dans la neutralisation du  $H_2O_2$ , en raison de leur capacité élevée à céder des atomes d'hydrogène de leurs groupements hydroxyles (Sumathy *et al.*, 2013 ; Rudrapal *et al.*, 2024). Le taux d'hydroxylation des cycles phénoliques varie en fonction de la structure du flavonoïde, ce qui influence leur potentiel antioxydant (Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Sumathy *et al.*, 2013). Nos résultats montrent que cette activité de piégeage est proportionnelle à la concentration de l'extrait, notamment pour EI.

Des études ont confirmé ces résultats en utilisant une gamme de concentrations d'extrait de 0.5-3 mg/ml. L'activité antioxydante, mesurée par la capacité à réduire le  $H_2O_2$ , était significativement plus élevée à des concentrations plus élevées, démontrant une relation linéaire entre la concentration de l'extrait et l'activité du piègeur (Stagos, 2020).

Paradoxalement, les résultats de l'acide gallique à 5, 10 et 25  $\mu\text{g/ml}$ , montrent que plus la concentration du standard augmente, plus le taux d'inhibition diminue. Cela pourrait être expliqué par la présence de  $Fe^{2+}$  ( $FeSO_4$  du milieu réactionnel), un métal de transition reconnu pour influencer considérablement l'activité de l'acide gallique, impliquant l'inhibition ou la production de radicaux libres (Aruoma *et al.*, 1993 ; Lima *et al.*, 2023). Une étude a démontré que l'acide gallique en présence du fer, favorise la production du radical  $OH^\bullet$ , ce qui lui confère

la propriété de pro-oxydant dans les systèmes de type Fenton (Lima *et al.*, 2023). Une autre étude a démontré que si le rapport molaire acide gallique:Fe est < 2, l'effet global de l'acide gallique est prooxydant, et si le rapport molaire acide gallique:Fe est > 2, le rôle global est antioxydant (Strilc *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2023).

### II.2.2. Activité scavenger du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH•) est le plus réactif des radicaux libres. Sa formation est favorisée par la présence de métaux de transition en passant par la formation de complexes intermédiaires (Baudin, 2020) :

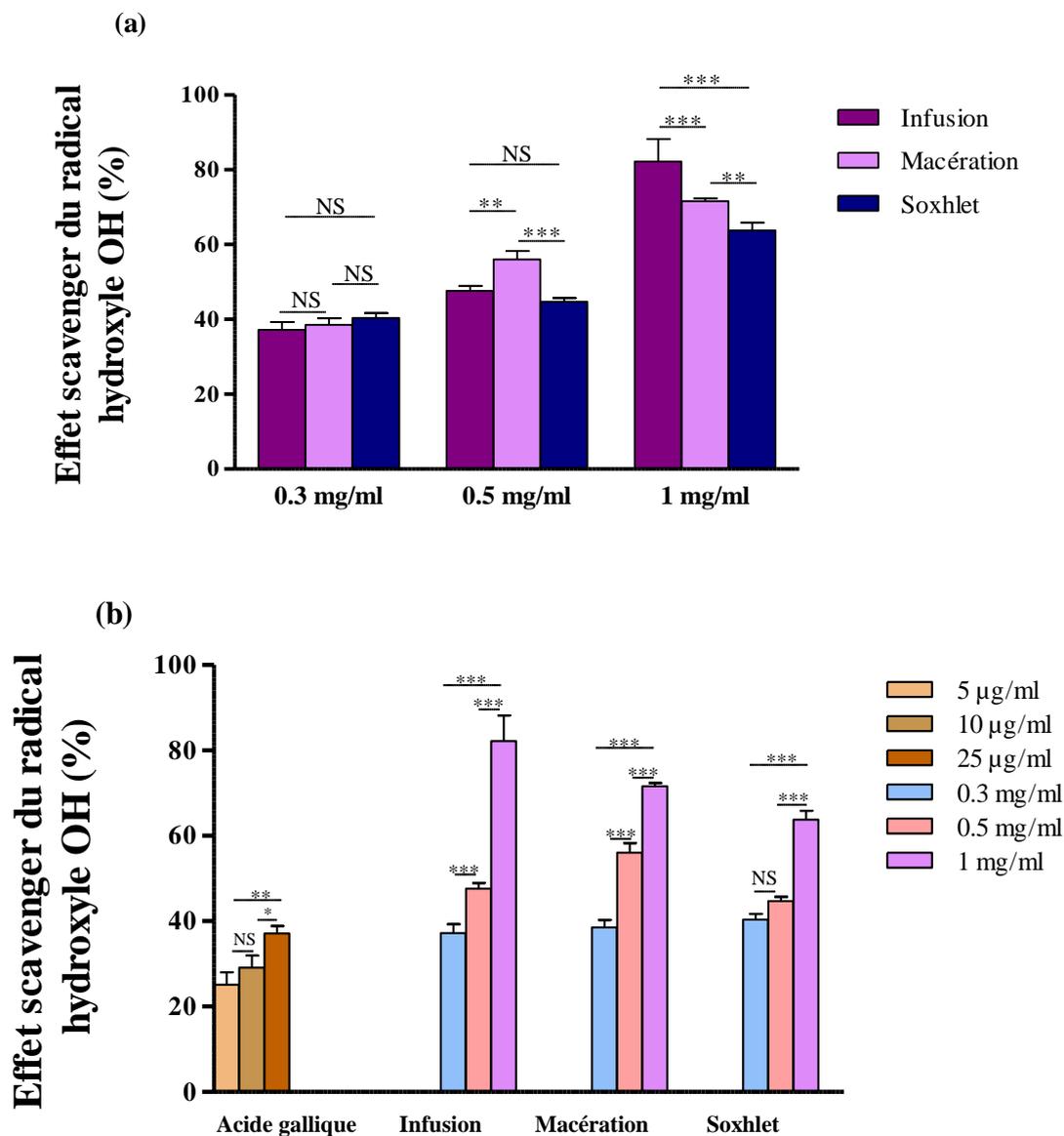


Dans la réaction entre Fe<sup>2+</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les complexes intermédiaires incluent principalement le complexe transitoire [Fe(II)(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup>, qui se transforme en complexe ferryl [Fe(IV)=O]<sup>2+</sup> avant de se décomposer en Fe<sup>3+</sup>, un radical hydroxyle (OH•), et un ion hydroxyle (OH<sup>-</sup>). Ce mécanisme, connu sous le nom de réaction de Fenton, permet la production de radicaux libres hautement réactifs (Fischbacher *et al.*, 2017).

Dans l'essai de l'activité scavenger du OH•, la réaction est basée sur l'oxydation du fer (FeSO<sub>4</sub>) par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) afin de générer des radicaux hydroxyles (OH•). Les radicaux hydroxyles formés réagissent avec le salicylate de sodium pour former un complexe hydroxylé qui absorbe à 562 nm. L'évaluation de la capacité des extraits à neutraliser les radicaux hydroxyles a été réalisée aux différentes concentrations (0.3, 0.5 et 1 mg/ml). L'acide gallique, est utilisé comme antioxydant de référence (Figure 11b).

A une concentration de 0.3 mg/ml, aucune différence significative n'a été observée entre les EI (37.21 ± 2.05%), EM (38.56 ± 1.69%) et ES (40.33 ± 1.36%) pour l'inhibition de l'oxydation du radical OH•. A 0.5 mg/ml, la valeur obtenue par macération (56.03 ± 2.26%) est significativement supérieure à celle obtenue par infusion (47.63 ± 1.30%, p < 0.01) et par Soxhlet (44.73 ± 0.94%, p < 0.001). A 1 mg/ml, EI a révélé un taux de neutralisation du radical hydroxyle de 82.22 ± 6.01%. Cette valeur est significativement supérieure (p < 0.001) à celle obtenue par macération (71.58 ± 0.80%) et Soxhlet (63.80 ± 2.08%). Une différence significative (p < 0.01) a été également retrouvée entre les EM et ES (Figure 11a).

Des études ont montré que les méthodes d'extraction n'affectaient pas significativement l'efficacité antioxydante d'extraits de plantes médicinales (Azmir *et al.*, 2013 ; Dhanani *et al.*, 2013).



**Figure 11 :** Effet scavenger du radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) par les trois extraits de pelure de grenade *Punica granatum* et l'acide gallique. (a) comparaison entre les extraits. (b) comparaison entre les différentes concentrations.

À 0.3 mg/ml, les concentrations de composés actifs seraient suffisantes pour exercer une activité scavenger, mais n'atteignent pas une différence significative entre les différents extraits étudiés. De plus, à des concentrations plus élevées, la présence d'une plus grande diversité de composés antioxydants extraits par infusion et macération pourrait créer des effets synergiques, augmentant ainsi l'activité scavenger du radical OH• (Figure 11a), (Pinelo *et al.*, 2005 ; Côté *et al.*, 2010).

EI montre l'effet scavenger du radical OH• le plus élevé à 1 mg/ml. Ce résultat est en accord avec le résultat obtenu par Maghsoudlou *et al.* (2019). En outre, la pelure de grenade est connue pour sa grande richesse en tanins hydrolysables dont les ellagitanins tels que la punicalagine. Ces composés sont caractérisés par une bonne solubilité dans l'eau. Il est donc possible qu'ils se trouvent en plus grande quantité dans l'extrait aqueux et non dans l'extrait éthanolique, ce qui serait lié à sa capacité neutralisant le OH• la plus élevée (Cruz-Valenzuela *et al.*, 2022).

L'extrait de l'infusion a révélé des taux d'inhibition croissants suivant les concentrations 0.3 (37.21 ± 2.05%), 0.5 (47.63 ± 1.30%) et 1 mg/ml (82.22 ± 6.01%). En effet, une différence significative ( $p < 0.001$ ) a été observée entre les trois concentrations. Le même résultat a été enregistré avec l'EM où le pourcentage d'inhibition est égal à 38.56 ± 1.69% à 0.3 mg/ml, 56.03 ± 2.26% à 0.5 mg/ml et 71.58 ± 0.80% à 1 mg/ml. Au contraire, aucune différence significative n'a été observée dans l'ES entre 0.3 mg/ml (40.33 ± 1.36%) et 0.5 mg/ml (44.73 ± 0.94%). Néanmoins, L'effet neutralisant du OH• obtenu avec l'ES à 1 mg/ml (63.80 ± 2.08 %) est significativement supérieur ( $p < 0.001$ ) aux valeurs obtenues à 0.3 et 0.5 mg/ml (Figure 11 (b)).

Ces résultats révèlent que la capacité scavenger du OH• par les EI et EM est proportionnelle à la concentration de l'extrait. Cette augmentation pourrait être attribuée à une combinaison de facteurs liés aux propriétés chimiques des composés phénoliques contenus dans chacun des deux extraits, notamment la capacité de donation d'atomes d'hydrogène et la polarité ainsi que la sélectivité. Les composés bioactifs contenus dans ces extraits interagissent avec les radicaux OH• de manière sélective, et lorsque la concentration de l'extrait augmente, la probabilité d'interaction avec les radicaux OH• s'accroît, augmentant ainsi l'efficacité de l'inhibition (Pabón-Baquero *et al.*, 2018 ; Dessie *et al.*, 2022). En revanche, pour l'ES, une différence non significative entre les concentrations de 0.3 et 0.5 mg/ml a été observée. Cela pourrait être expliqué par le fait que les composés antioxydants extraits à ces concentrations atteignent un maximum d'efficacité. Cependant, à 1 mg/ml, la concentration de ces composés permet d'atteindre un potentiel anti-oxydant supérieur (Pabón-Baquero *et al.*, 2018).

Les résultats de l'acide gallique à 5, 10 et 25 µg/ml montrent que l'effet scavenger du radical OH• augmente proportionnellement à l'augmentation de la concentration. Ceci montre un effet dose-dépendant. Les antioxydants comme l'acide gallique agissent en neutralisant les radicaux libres et en inhibant les réactions d'oxydation. À des concentrations plus élevées, ils ont plus de molécules disponibles pour réagir avec les radicaux libres, ce qui conduit à une inhibition accrue de l'oxydation. De plus, à des concentrations plus élevées, l'acide gallique est plus soluble dans les solutions aqueuses, ce qui facilite sa diffusion et son interaction en présence des radicaux libres (Djeridane *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2013).

### II.2.3. Activité scavenger du monoxyde d'azote

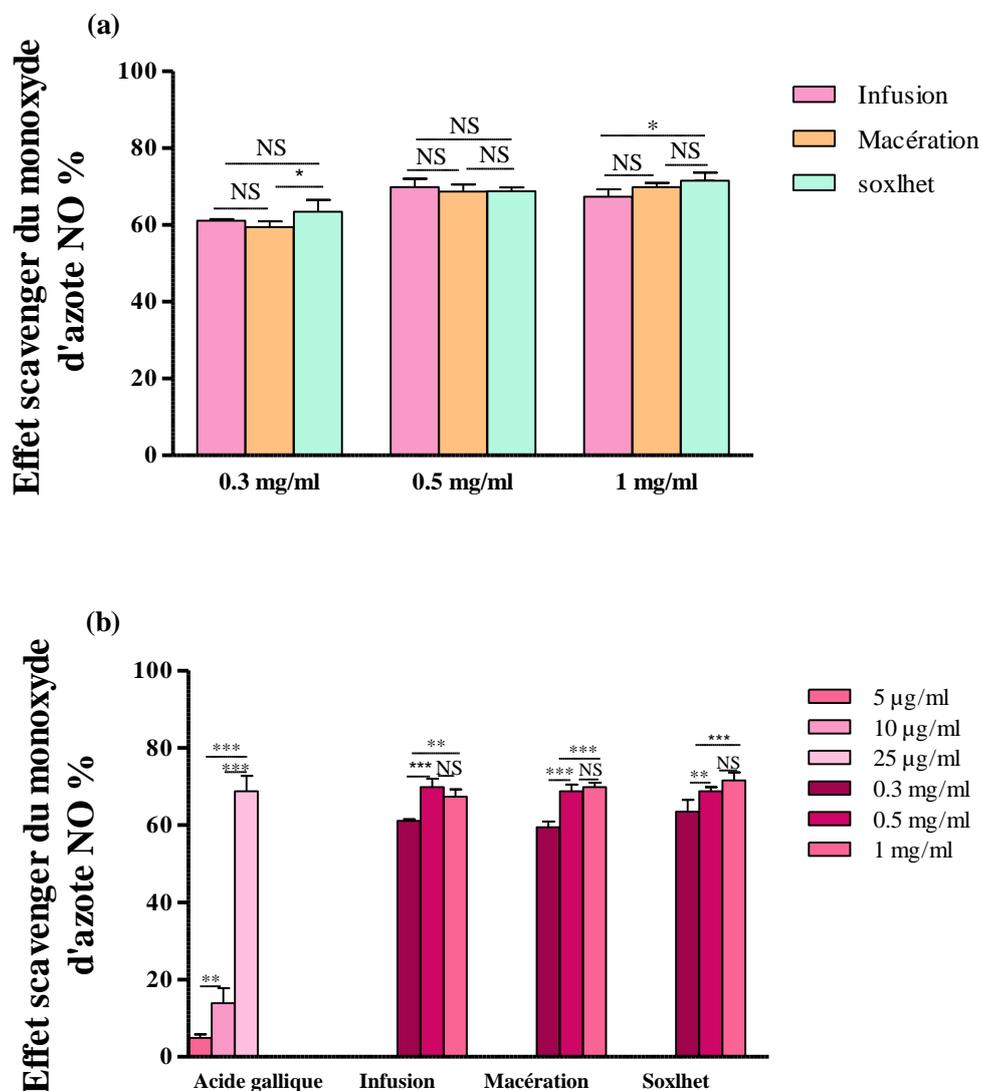
Le monoxyde d'azote est un composé radicalaire réactif généré dans les tissus par différentes enzymes appelées monoxyde d'azote synthases (NOS). En raison de sa solubilité dans l'eau et les lipides, il diffuse facilement à travers les membranes cellulaires (Andrew et Mayer, 1999 ; Mitra et Altit, 2023).

La capacité des trois extraits de pelure de grenade (infusion, macération et soxhlet) aux concentrations de 0.3, 0.5 et 1mg /ml, à neutraliser le monoxyde d'azote est estimée selon la méthode décrite par Awah et Verla (2010). Le nitroprussiate de sodium dans du tampon phosphate salin (PBS) en présence de la lumière génère du NO•. Celui-ci interagit avec l'oxygène pour produire des ions nitrites NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, mis en évidence par le réactif de Griess. L'acide gallique est utilisé comme standard.

Les résultats de l'activité scavenger du NO• exercée par les trois extraits étudiés, sont illustrés dans la figure 12.

La comparaison entre les différents extraits montre qu'à 0.3 mg/ml, aucune différence significative n'a été observée entre EI et ES (61.11± 0.40% et 63.46 ± 3.09 %, respectivement) et entre EI et EM (59.49 ± 1.46%). Cependant une différence significative (p < 0.05) a été obtenue entre EM et ES. Par ailleurs, à 0.5 mg/ml, aucune différence significative n'a été notée entre les trois extraits EI, EM et ES (69.87 ± 2.15% ; 68.75 ± 1.77 % et 68.80 ± 1.01%, respectivement). À 1 mg/ml, ES et EM ont montré des taux équivalents pour la neutralisation du NO• (71.55 ± 2.11%et 69.85± 1.11%, respectivement). De même, aucune différence significative n'a été enregistrée entre EI (67.39 ± 1.87%) et EM (69.85± 1.11%). Tandis qu'une différence significative (p < 0.05) a été enregistrée entre ES et EI (71.55 ± 2.11% et 67.39 ± 1.87%) (Figure 12a).

À une concentration de 0.3 mg/ml, les molécules bioactives exercent une même activité scavenger pour les trois extraits. Par contre à 0.5 et 1 mg/ml, ES révèle une activité scavenger du NO• légèrement plus prononcée, probablement due à la présence d'interactions entre une plus grande diversité de composés bioactifs présente dans l'extrait (Côté *et al.*, 2010).



**Figure 12 :** Effet scavenger du monoxyde d'azote (NO) par les trois extraits de pelure de grenade *Punica granatum* et l'acide gallique. **(a):** comparaison selon les concentrations (0,3mg/ml, 0,5mg/ml et 1mg/ml). **(b):** comparaison selon les techniques d'extraction (Infusion, Macération et Soxhlet).

La comparaison entre les différentes concentrations montre qu'aucune différence significative du taux d'inhibition de l'oxydation du NO• n'a été observée entre les concentrations 0.5mg/ml ( $69.87 \pm 2.16\%$ ) et 1 mg/ml ( $67.39 \pm 1.87\%$ ) pour EI. Ces deux

valeurs sont significativement supérieures ( $p < 0.001$ ) à celle obtenue à 0.3mg/ml ( $61.11 \pm 0.40\%$ ). Pour EM, aucune différence significative n'a également été enregistrée entre 0.5 et 1 mg/ml ( $68.75 \pm 1.77\%$  ;  $69.85 \pm 1.11\%$  respectivement), comparés à 0.3 mg/ml ( $59.49 \pm 1.46\%$ ). Enfin pour ES à 0.3 mg/ml, un taux d'inhibition de  $63.46 \pm 3.09\%$  significativement inférieur, par rapport à 5 mg/ml ( $69.87 \pm 2.16\%$ ,  $p < 0.01$ ) et à 1 mg/ml ( $71.54 \pm 2.11\%$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 12b).

Le pouvoir scavenger du  $\text{NO}^\bullet$  par les différents extraits est compris entre 60 et 70%. Cette activité serait associée à leurs contenus en polyphénols totaux. En effet, des recherches ont montré que l'extrait d'une plante réduit la quantité de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) produites par la décomposition du nitroprussiate de sodium *in vitro*. Ce phénomène sont attribuables aux propriétés antioxydantes des polyphénols de l'extrait, qui pourraient entrer en compétition avec l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) pour réagir avec  $\text{NO}^\bullet$ , inhibant ainsi la formation de nitrite. Les produits végétaux pourraient donc inhiber la formation de  $\text{NO}^\bullet$  et jouer ainsi un rôle important dans la prévention des effets néfastes liés à une production excessive de  $\text{NO}^\bullet$  (Qiao *et al.*, 2009).

De plus, les extraits de la pelure de grenade ont révélé un potentiel anti-  $\text{NO}^\bullet$  considérable, cet effet revient probablement à des interactions entre les différentes structures des molécules bioactives contenues dans les extraits. Une analyse phytochimique quantitative indique que la plante contient des quantités importantes de composés phénoliques (acide ellagique, ellagitanins et acide gallique) responsables de l'activité antioxydante et du piégeage des radicaux libres (Saparbekova *et al.*, 2023 ; Teniente *et al.*, 2023).

Concernant l'acide gallique, un faible taux d'inhibition de l'oxydation du  $\text{NO}^\bullet$  a été obtenu à  $5\mu\text{g/ml}$  ( $0.73 \pm 0.81\%$ ). Avec l'augmentation de la concentration la capacité de neutralisation du  $\text{NO}$  a également augmenté à  $10\mu\text{g/ml}$  ( $10.13 \pm 3.86\%$ ) puis à  $25\mu\text{g/ml}$  ( $68.66 \pm 0.21\%$ ) (figure 12). Une étude a examiné l'effet de différentes concentrations d'acide gallique sur son activité antioxydante. Les résultats montrent que la capacité à inhiber l'oxydation de l'acide gallique augmente de manière dose-dépendante. Parallèlement, les différents extraits ont révélé une grande capacité à neutraliser le radical  $\text{NO}^\bullet$  avec l'augmentation des concentrations (0.3, 0.5 et 1 mg/ml). Ce résultat est en accord avec le résultat obtenu par l'acide gallique. Plus la concentration est élevée, plus les substances bioactives sont disponibles pour neutraliser les espèces réactives (Kim *et al.*, 2013).

## **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

La présente étude a été réalisée dans le but de valoriser un sous-produit naturel qui est la pelure de grenade (*Punica granatum*). Trois différents extraits ont été préparés par infusion (EI), macération (EM) et Soxhlet (ES). Leur contenu en polyphénols totaux a été évalué, puis leur activité antioxydante envers le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) et le monoxyde d'azote ( $NO^\bullet$ ), a été analysée à différentes concentrations (0.3, 0.5 et 1 mg/ml).

Le dosage des TPC a révélé que la teneur la plus élevée est contenue dans les deux extraits de macération ( $302.05 \pm 3.51$  mg EAG/g) et Soxhlet ( $291.29 \pm 6.51$  mg EAG/g). Néanmoins, bien que la teneur en TPC obtenue dans EI ( $264.69 \pm 7.28$  mg EAG/g) soit significativement inférieure, elle reste relativement élevée.

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité scavenger du  $H_2O_2$ , du  $OH^\bullet$  et du  $NO^\bullet$  a montré que les trois extraits de la pelure de grenade à différentes concentrations possèdent un pouvoir antioxydant potentiel. Les résultats de l'évaluation de l'activité scavenger du  $H_2O_2$  a montré que le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de ce dernier le plus bas a été obtenu par ES à 0.3 mg/ml ( $65.15 \pm 3.63\%$ ), et le plus élevé, par EI à 1 mg/ml ( $82.36 \pm 1.50\%$ ). Cependant, l'effet scavenger du radical hydroxyle semble être dose-dépendant. EI montre le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du  $OH^\bullet$  le plus élevé atteignant 82% à 1 mg/ml.

Quant au monoxyde d'azote, les variations se rapprochent énormément, avec un taux de neutralisation du  $NO^\bullet$  minimal de  $59.49 \pm 1.46\%$  pour EM à 0.5 mg/ml, et maximal de  $71.54 \pm 2.11\%$  pour ES à 1 mg/ml. En revanche, ce potentiel serait influencé davantage par la diversité des structures chimiques de ces composés et probablement par les interactions entre eux, qui sont susceptibles d'améliorer leur potentiel antioxydant.

Notre étude montre que l'EPG est extrêmement efficace contre les espèces réactives  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$  et  $NO^\bullet$ . Ces médiateurs du stress oxydant sont reconnus pour être fortement impliqués dans la pathogenèse de plusieurs maladies chroniques. Le potentiel antioxydant démontré dans ce travail serait associé non seulement au contenu en polyphénols des différents extraits EI, EM et ES mais probablement à leur diversité structurale, impliquant ainsi une relation structure activité. Il est donc plus que recommandé d'exploiter d'avantage la pelure de grenade pour une meilleure valorisation de ce sous-produit naturel.

## Conclusion et perspectives

En perspectives de ce travail, il serait intéressant :

- De doser d'autres composés bioactifs, notamment les tanins hydrolysables, dont la pelure de grenade est particulièrement très riche.
- D'identifier la nature des composés phénoliques en réalisant des analyses par HPLC.
- D'utiliser des méthodes d'extraction non-conventionnelles et de comparer les résultats aux méthodes conventionnelles.
- D'étudier les propriétés biologiques de ces extraits *in vivo*.
- D'exploiter la pelure de grenade en vue de développer un complément alimentaire.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. (2017). Natural Polyphenols: An Overview. *International Journal of Food Properties* ; 20 :1689-1699.
- Ait Otmane K, Ait Souki S. (2022). Etude comparative de méthodes conventionnelles d'extraction de composés phénoliques de la pelure de grenade. 16-17.
- Akhtar S, Ismail T, Fraternali D, Sestili P. (2017). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry* ; 174 : 417-425.
- Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*.
- Alexandre EMC, Silva S, Santos SAO *et al.* (2019). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food Research International* ; 115 : 167-176.
- Ali U, Kumar P. Effect of Soxhlet and Ultrasound assisted extraction on antioxidant activity of pomegranate peel extract. (2014). *International Journal of Food and Nutritional Sciences* ; 3 (Supp 6) : 256-270.
- Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Metwally DM et Abdel Moneim AE. (2014). Effets protecteurs du jus de grenade (*Punica granatum*) sur les testicules contre l'intoxication au tétrachlorure de carbone chez le rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine* ; 14 : 164.
- Andrew PJ, Mayer B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* ; 43 : 521–531.
- Anila A, Mohammed F. (2022). Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Applied Sciences* ; 12 : 2107.
- Archivio MD, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. (2007). Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* ; 43 : 348.
- Aruna P, Venkataramanamma D, Singh AK, Singh RP. (2016). Health Benefits of Punicic Acid: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* ; 15 : 16–27.
- Arun N, Singh DP. (2012). *Punica granatum*: A review on pharmacological and therapeutic properties. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* ; 3 : 1240–1245.
- Aruoma OI, Murcia A, Butler J, Halliwell B. (1993). Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 41: 1880-1885.
- Aurelio DL, Edgardo RG, Navarro-Galindo S.(2008). Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *International Journal of Food Science & Technology* ; 43 : 322-325.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahenan F, Omar A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* ; 117 (Supp 4), 426-436.
- Azwanida NN. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*; 4 : 196.
- BaradaranRahimi V, Ghadiri M, Ramezani M, Askari VR. (2020). Anti-inflammatory and anti-cancer activities of pomegranate and its constituent, ellagic acid: Evidence from cellular, animal, and clinical studies. *Phytotherapy Research* ; 34 : 685–720.
- Barathiannan K, Venkatadri B, Khusro A, Al-Dhabi NA et Agastian P. (2016). Analyse chimique de la peau du fruit de *Punica granatum* et de ses propriétés biologiques in vitro et in vivo. *BMC Complementary and Alternative Medicine* ; 16 : 264.

## Références bibliographiques

- Bensid A, El Abed N, Houicher A, Regenstein JM, ÖzogulF. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Preservatives: Properties, Mechanism of Action and Applications in Food—a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* ; 62 ; 2985–3001.
- Berdowska I, Matusiewicz M, Fecka I. (2021). Punicalagin in Cancer Prevention-Via Signaling Pathways Targeting. *Nutrients* ; 13 : 2733.
- Baudin B. (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue francophone des laboratoires* ; 522 : 56-61.
- Bensakhria A. (2018). Le Stress Oxydatif. *Toxicologie générale : Chapitre IX*.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, KalayciO.(2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* ; 5 : 9–19.
- Bonnefont-Rousselot D. (2006). Oxidative stress : Conclusions, future prospects and recommandations. *Annales pharmaceutiques Françaises* ; 64 (Supp 6) : 402-405.
- Bourgou S, Serairi RB, Medini F, Ksouri R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia* ; 28 (Supp 12).
- Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* ; 15 : 186-190.
- ChiuehC.C.(1999). Neuroprotective properties of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 890 : 301–11.
- Çavdar HK, Yanık DK, Gök U, Göğüş F. (2017). Optimisation of Microwave-Assisted Extraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil and Evaluation of Its Physicochemical and Bioactive Properties. *Food Technology and Biotechnology* ; 55 : 86-94.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry* ; 34 : 540-560.
- Coronado-Reyes JA, Cortés-Penagos CDJ, Gonzalez-Hernandez JC. (2020). Chemical composition and great applications to the fruit of the pomegranate (*Punica granatum*): a review. *Food Science and Technology, (Campinas)* ; 42.
- Côté J, Caillet S, Doyon G, Sylvain J. F, Lacroix M. (2010). Bioactive compounds in cranberry juice and their stability during storage. *International Journal of Food Science & Technology* ; 45 (Supp 8) : 1595-1605.
- Cutrim CS, Cortez MAS. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology* ; 71 : 564–578.
- Daoutidou M, Plessas S, Alexopoulos A, Mantzourani I. (2021). Assessment of antimicrobial activity of pomegranate, cranberry, and black chokeberry extracts against foodborne pathogens. *Foods* ; 10 (Supp 3) : 486.
- Das AK, Nanda PK, Chowdhury NR, Dandapat P, Gagaoua M, Chauhan P, Pateiro M, Lorenzo JM. (2021). Application of Pomegranate by-Products in Muscle Foods: Oxidative Indices, Colour Stability, Shelf Life and Health Benefits. *Molecules* ; 26: 467.
- de Carvalho JTG, Baldivia DDS, de Castro DTH, Dos Santos HF, Dos Santos CM, Oliveira AS, Alfredo TM, Vilharva KN, de Picoli Souza K, Dos Santos EL. (2020). The Immunoregulatory Function of Polyphenols: Implications in Cancer Immunity. *Journal of Nutritional Biochemistry* ; 85 : 108428.

## Références bibliographiques

- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* ; 18 : 1818–92.
- Dessie TA, Akele ML, Melese AT. (2022). Analysis of total phenolic contents, flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of *Croton macrostachyus* root extracts. *BMC Chemistry* ; 16 : 30.
- Dhanani T, Shah S, Gajbhiye NA, Kumar S. (2013). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents, and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry* ; 10 : 1193-1199.
- Dias R, Pereira CB, Pérez-Gregorio R, Mateus N, Freitas V. (2021). Recent Advances on Dietary Polyphenol's Potential Roles in Celiac Disease. *Trends in Food Science and Technology* ; 107 : 213–225.
- Di Napoli A, Germani F, Parisi F and Zucchetti P. (2023). The beneficial effects of pomegranate (*Punica Granatum L.*) consumption on human health : A review *pharmadvances* ; 5 : 15-28.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* ; 97 (Supp 4) : 654-660.
- Eghbali S, Askari SF, Avan R, Sahebkar A. (2021). Therapeutic Effects of *Punica granatum* (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. *Journal of Nutrition and Metabolism* ; 5297162
- Eskilsson CS, Bjorklund E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Chromatography A* ; 902 : 227–250.
- Fenton H. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions* ; 65 : 899–910.
- Fischbacher A, Sonntag CV, Schmidt TC. (2017). Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen peroxide/Fe(II) ratios. *Chemosphere* ; 182 : 738-744.
- Frosi I, Montagna I, Colombo R, Milanese C, Papetti A. (2021). Recovery of chlorogenic acids from agri-food wastes: updates on green extraction techniques. *Molecules* ; 26 ( Supp 15) : 4515.
- Ge S, Duo L, Wang J, Gegen Z, Yang J, Li Z, Tu Y. (2021). A Unique Understanding of Traditional Medicine of Pomegranate, *Punica granatum L.* and Its Current Research Status. *Journal of Ethnopharmacology* ; 271 : 113877.
- Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* ; 53 : 1370–1373.
- Ghavipour M, Sotoudeh G, Tavakoli E, Mowla K, Hasanzadeh J, Mazloom Z. (2017). Pomegranate extract alleviates disease activity and some blood biomarkers of inflammation and oxidative stress in rheumatoid arthritis patients. *European Journal of Clinical Nutrition* ; 71 : 92–6.
- Gillard M. (2022). La quantité d'oxygène sur Terre aurait longtemps stagné à des taux très bas.
- Graham SA, Hall J, Sytsma K, and Shi S. (2005). Phylogenetic analysis of the Lythraceae based on four gene regions and morphology. *International Journal of Plant Sciences* ; 166 : 995-1017.
- Haber F, Weiss J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London (A)* ; 147 : 332–51.
- Haj AM, Alokiah BA, Badr ADR. (2018). In vitro antibacterial effects of pomegranate fruit peel infusion against two diarrheagenic bacteria ; 56 (Supp 4) : 203-206.

## Références bibliographiques

- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, chapel JP. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège* ; 62 (Supp 10) : 628-38.
- Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* ; 35: 1147–1150.
- Halliwell B, Clement MV, Long LH. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* ; 486 (Supp 1) : 10–3.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (2015). Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. *Free Radicals in Biology and Medicine* ; 199-283.
- Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K. (2010). Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. ; 11 : 1365–1402.
- Harborne JB, Williams CA. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* ; 55 : 481–504.
- Hlima H, Bohli T, Kraiem M, Ouederni A, Mellouli L, Michaud P, Abdelkafi S, Smaoui S. (2019). Combined Effect of *Spirulina Plantensis* and *Punica Granatum* Peel Extracts : Phytochemical Content and Antiphytopathogenic Activity. *Applied Sciences* ; 9 (Supp 24) : 5475.
- Houston DM, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. (2017). Anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* ; 112 : 30–7.
- Huang J, He W, Yan C, Du X, Shi X. (2017). Microwave-assisted extraction of flavonoids from pomegranate peeling and its antioxidant activity. *BIO Web of Conferences* ; 8 : 1–6.
- Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou M.C and Rahu N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Ibañez E, Kubátová A, Señoráns F.J, Cavero S, Reglero U, Hawthorne S.B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 51 : 375–382.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chandhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 84:9265–9.
- Jasuja ND, Saxena R, Chandra S, Sharma R. (2013). Pharmacological Characterization and Beneficial Uses of *Punica granatum*. *Asian Journal of Plant Sciences* ; 11 : 251–267.
- Johanningsmeier SD, Harris GK. (2011). Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology* ; 2: 181-201.
- Juránek I, Nikitovic D, Kouretas D, Hayes AW, Tsatsakis AM. (2013). Biological importance of reactive oxygen species in relation of difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* ; 61: 240–247.
- Jurenka JS. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review* ; 13(Supp 2) : 128-44.
- Kamali M, Tavakoli H, Khodadoost M, Daghighzadeh H, Kamalinejad M, Gachkar L, *et al.* (2015). Efficacy of the *Punica granatum* peels aqueous extract for symptom management in ulcerative colitis patients. A randomized, placebo controlled, clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. ; 21 : 141–6.
- Kamil Hussain M, Saquib M, Faheem Khan M. (2019). *Natural Bio-active Compounds*. Springer ; 179–200.

## Références bibliographiques

- Kim JS, Kang OJ, Gweon OC. (2013). Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods* ; 5(Supp 1) : 80-86.
- Lamy E, Pinheiro C, Rodrigues L, Capela-Silva F, Lopes O, Tavares S, Gaspar R. (2016) Determinants of Tannin-Rich Food and Beverage Consumption: Oral Perception vs. Psychosocial Aspects. *Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties* 29-58.
- Lansky EP, Newman RA. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* ; 109 : 177–206.
- Laparra JM, Sanz Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research* ; 61 : 219–25.
- Lewandowska U, Fichna J, Gorlach S. (2016). Enhancement of Anticancer Potential of Polyphenols by Covalent Modifications. *Biochemical Pharmacology* ; 109 : 1–13.
- Li HB, Jiang Y, Wong CC. (2007). Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* ; 388 (Supp 2) : 483–488.
- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. (2006). Évaluation des propriétés antioxydantes de l'extrait d'écorce de grenade par rapport à l'extrait de pulpe de grenade. *Chimie alimentaire* ; 96 : 254-260.
- Li Y, Ye T, Yang F, Hu M, Liang L, He H, Li Z, Zeng A, Li Y, Yao Y, Xie Y. (2016). *Punica granatum* (pomegranate) peel extract exerts potent antitumor and anti-metastasis activity in thyroid cancer. *RSC Advances* ; 6 (Supp 87) : 84523-84535.
- Lima JP, Tabelini CH, Aguiar A. (2023). A Review of Gallic Acid-Mediated Fenton Processes for Degrading Emerging Pollutants and Dyes. *Molecules* ; 28 (Supp 3) : 1166.
- Liu X, Wang L, He B, Liu Q, Zhu H, Andrew JC, Ken DO, Zhang X.(2023). Mechanistic Insights into Myofibrillar Protein Oxidation by Fenton Chemistry Regulated by Gallic Acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* ; 71 (Supp 33) : 12587–12596.
- Lloyd I. (2009). Traditional and Complementary Systems of Medicine. In *The Energetics of Health*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; 13–27.
- Longtin R. (2003). The pomegranate: nature's power fruit? *Journal of the National Cancer Institute* ; 95 (Supp 5) : 3468.
- López-Malo A, Alzamora SM, Paris MJ, Lastra-Vargas L, Coronel MB, Gómez PL, Palou E. (2020). Naturally Occurring Compounds–Plant Sources. In *Antimicrobials in Food*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; 527–594.
- Maghsoudlou Y, AsghariGhajari M, Tavasoli S. (2019). Effects of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of quince fruit and its tisane's sensory properties. *Journal of Food Science and Technology* ; 56 : 2365–2372.
- Majidinia M, Bishayee A, Yousefi B. (2019). Polyphenols: Major Regulators of Key Components of DNA Damage Response in Cancer. *DNA Repair* ; 82.
- Mancini M, Cerny MEV, Cardoso NS, Verissimo G, Maluf SW. (2023). Grape Seed Components as Protectors of Inflammation, DNA Damage, and Cancer. *Current Nutrition Reports*. ; 12 : 141–150.
- Maphetu N, Olisah C, Unuofin JO, Lebelo SL. (2022). Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum L.* (pomegranate) plant extracts: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* ; 153.
- Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*.

## Références bibliographiques

- Meselhy K, Shams M, Sherif N, El-sonbaty S. (2020). Phytochemical study, potential cytotoxic and antioxidant activities of selected food byproducts (Pomegranate peel, Rice bran, Rice straw & Mulberry bark). Formerly Natural Product Letters ; 34 : 530-533.
- Mihanfar, A, Nouri M. Roshangar L, Khadem-Ansari MH. (2021). Polyphenols: Natural Compounds with Promising Potential in Treating Polycystic Ovary Syndrome. Reproductive Biology ; 21.
- Mitra S , Altit G.(2023). L'utilisation du monoxyde d'azote inhalé chez les nouveau-nés. Paediatrics & Child Health ; 28 : 123–127.
- Moga MA, Dimienescu OG, Bălan A, Dima L, Toma SI, Bîgiu NF, Blidaru A. (2021). Pharmacological and Therapeutic Properties of *Punica granatum* Phytochemicals: Possible Roles in Breast Cancer. Molecules ; 26 : 1054.
- Mosic M, Dramicanin A, Ristivojevic P, Milojkovic OD. (2020). Extraction as a critical step in phytochemical Analysis. Journal of AOAC International ; 103 : 365–372.
- Mugoni V, Santoro MM. (2013). Manipulating redox signaling to block tumor angiogenesis, research directions in tumor angiogenesis, Dr. Jianyuan Chai (Ed.), InTech.
- Mukherji SM, Singh SP. (1986). Reaction mechanism in organic chemistry. Madras: Macmillan IndiaPress.
- Mushtaq M, Sultane B, Anwar F, Adnanc A. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. The Journal of Supercritical Fluids ; 104 : 122-131.
- Nani A, Murtaza B, Sayed Khan A, Khan NA, Hichami A. (2021). Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Polyphenols Contained in Mediterranean Diet in Obesity: Molecular Mechanisms. Molecules ; 26 : 985.
- Osorio-Tobón JF. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. Food Science Technology ; 57 : 4299-4315.
- Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. (2019). Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. Frontiers in Microbiology ; 10 : 911.
- Ouelbani R, Bensari S, Mouas TN, Khelifi D. (2016). Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). Journal of Ethnopharmacology ; 194 : 196–218.
- Ouznadji A. (2020). Stress nitrosant et pathologies. Revue Francophone des Laboratoires ; 522 :39-46.
- Ozkan E, Seyhan MF, Kurt Sirin O, Yilmaz Ozden T, Ersoy E, HatipogluCakmar SD, Goren AC, Yilmaz Aydogan H, Ozturk O. (2021). Antiproliferative effects of Turkish pomegranate (*Punica granatum L.*) extracts on MCF-7 human breast cancer cell lines with focus on antioxidant potential and bioactive compounds analyzed by LC-MS/MS. Journal of Food Biochemistry ; 45: 13904.
- Ozougwu JC. (2016). The Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Oxidative Stress. International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences. 3: 1-8.
- Pabón-Baquero LC, Otálvaro-Álvarez ÁM, Fernández MRR, *et al.* (2018). Plant Extracts as Antioxidant Additives for Food Industry. Antioxidants in Foods and Its Applications. InTech.
- Pandey KB, Rizvi SI. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity ; 2 : 270–278.
- Patra S, Pradhan B, Nayak R, Behera C, Das S, Patra SK, Efferth T, Jena M, Bhutia SK. (2021). Dietary Polyphenols in Chemoprevention and Synergistic Effect in Cancer: Clinical Evidences and Molecular Mechanisms of Action. Phytomedicine ; 90.

## Références bibliographiques

- Percival, M. (1998). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights* ; 1-4.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* ; 30 (Supp 1) : 11–26.
- Pham-Huy LA, Hua H, Pham-Huy C.(2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedicine and Science* ; 4 (Supp 2) : 89–96.
- Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. (2005). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* ; 17 (Supp 11) : 579-590.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D. and Bitto A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Review article ; N°8416763.
- Qiao D , Ke C , Hu B, Luo J , Ye H, Sun Y, Yan X ; Zeng X.( 2009 ) Activités antioxydantes des polysaccharides d' *Hyriopsis cumingii* Carbopolyme, Polymères glucidiques ; 78 (Supp 2) : 199-204.
- Rahimi HR, Arastoo M, Ostad SN. (2012). A comprehensive review of *Punica granatum* (Pomegranate)properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. *Iran Journal of Pharmaceutical Research.* ; 11 : 385–400.
- Rana S, Dixit S, Mittal A. (2018). Screening of phytochemicals and bioactive compounds in *Punica Granatum* peel to evaluate its hematological potential. *Innovare journal of food science* ; 6.
- Ranjha MMAN, Amjad S, Ashraf S, Khawar L, Safdar MN, Jabbar S, Nadeem M, Mahmood Sh, Murtaza MA. (2020). Extraction of polyphenols from apple and pomegranate peels employing different extraction techniques for the development of functional date bars *International journal of fruits sciences* ; 20 (Supp 3) : 1201.
- Rathod NB, Elabed N, Punia S, Ozogul F, Kim SK and Rocha JM. (2023). Recent Developments in Polyphenol Applications on Human Health: A Review with Current Knowledge *plants* ; 12 : 1217.
- Rhazi N, Oumam M, Hannache H, Sesbou A, Charrier B, Pizzi A, Charrier-El Bouhtoury A. (2015). Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Industrial Crops and Products* ; 70 : 245-252.
- Rice-Evans C, Miller N and Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds ; 2 (Supp 4) : 152-159.
- Rostagno MA, Prado JM. (2013). *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Royal Society of Chemistry.
- Routray W, Orsat V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology* ; 5 (Supp 2) : 409-424.
- Rudrapal M, Rakshit G, Singh RP, Garse S , Khan J, Chakraborty S. (2024). Dietary Polyphenols: Review on Chemistry/Sources, Bioavailability/Metabolism, Antioxidant Effects, and Their Role in Disease Management . *Antioxidants* ; 13 (Supp 4) : 429.
- Saeed M, Naveed M, BiBi J, Kamboh AA, Arain MA, Shah QA, Alagawany M, El-Hack MEA, Abdel-Latif MA, Yattoo MI, et al. (2018). The Promising Pharmacological Effects and Therapeutic/Medicinal Applications of *Punica granatum L.* (Pomegranate) as a Functional Food in Humans and Animals. *Recent Patents in Inflammation & Allergy Drug Discovery* ; 12 : 24–38.
- Sajadimajd S, Bahramsoltani R, Iranpanah A, Patra JK, Das G, Gouda S, Rahimi R, Rezaei-amiri E, Cao H, Giampieri F. (2020). Advances on Natural Polyphenols as Anticancer Agents for Skin Cancer. *Pharmacological Research.* ; 151 : 104584.

## Références bibliographiques

- Saparbekova A, Kantureyeva G, Kudasova D, Konarbayeva Z, Latif A. (2023). Potential of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) by-product with significant antioxidant and therapeutic effects: A narrative review. *Saudi Journal of Biological Sciences* ; 30 (Supp 2) : 103553.
- Sebbar E, Naji I, EL Mezgueldi I, Choukri M. (2023). Oxidative stress, a cellular aggression. *Actualités Pharmaceutiques* ; 62 : 36-37.
- Sharma J, Maity A. (2010). Pomegranate Phytochemicals :Nutraceutical and Therapeutic Values. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* ; 4 : 56–76.
- Sharma P, McClees SF, Afaq F. (2017). Pomegranate for prevention and treatment of cancer: an update. *Molecules* ; 22 : 177.
- Sheidai M, Khandan M, Nasre ES. (2007). B-chromosomes in Iranian pomegranate (*Punica granatum*) cultivars. *Pakistan Journal of Botany* ; 39 : 85-91.
- Singh A, Yau YF, Leung KS, El-Nezami H, Lee JCY. (2020). Interaction of Polyphenols as Antioxidant and Anti-Inflammatory Compounds in Brain–Liver–Gut Axis. *Antioxidants* ; 9 : 669.
- Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. (2018). Phenolic Compounds as Beneficial Phytochemicals in Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel: A Review. *Food Chemistry* ; 261: 75–86.
- Singh J, Prasad R, Kaur H.P, Jajoria K, Chahal AS, Verma A, Kara M, Assouguem A, Bahhou J. (2023). Bioactive Compounds, Pharmacological Properties, and Utilization of Pomegranate (*Punica granatum L.*): A Comprehensive Review. *Tropical Journal of Natural Product Research* ; 7 (Supp 9) : 3856-3873.
- Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, Haddad MA, Al-Hiary M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of aoaC international* ; 102 : 5.
- Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, LeMieux M, Greer, B, Moustaid-Moussa, N. (2013). Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *Journal of Nutrition and Biochemistry* ; 24 (Supp 4) : 613-623.
- Sohal RS, Allen RG. (1990). Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Experimental Gerontology* ; 25: 499–522.
- Spencer JP, Abd El Mohsen M.M, Minihaane A.M, Mathers JC. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition* ; 99 : 12-22.
- Stover E, Mercure EW. (2007). The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. *Horticultural Science* ; 42 (Supp 5) : 1088–1092.
- Sumathy R, Sankaranarayanan S, Bama P, Ramachandran J, Vijayalakshmi M, Deecaraman M. (2013). Antioxidant and antihemolytic activity of flavonoid extract from fruit peel of *Punica granatum* ; 6 (Supp 2) : 0974-2441.
- Stagos D. (2020). Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts. *Antioxidants* ; 9 (Supp 1) : 19.
- Suručić R, Travar M, Petković M, Tubić B, Stojiljković MP, Grabež M, Šavikin K, Zdučić G, Škrbić R. (2021). Pomegranate peel extract polyphenols attenuate the SARS-CoV-2 S-glycoprotein binding ability to ACE2 receptor: in silico and in vitro studies. *Bioorganic Chemistry* ; 114.
- Tabbassum Z, Shadab A, Sadaf Z. (2019). Review of Characteristic Components, Traditional and Pharmacological Properties of *Punica granatum*. *RADS Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ; 7 (Supp 1) : 39-52.
- Teaima MH, Badawi NM, Attia DA, El-Nabarawi MA, Elmazar MM, Mousa SA. (2022). Efficacy of pomegranate extract loaded solid lipid nanoparticles transdermal emulgel against Ehrlich ascites carcinoma. *Nanomedicine* ; 39 : 102466.

## Références bibliographiques

- Tamborlin L, Sumere BR, de Souza MC, Pestana NF, Aguiar AC, Eberlin MN, Simabuco FM, Rostagno MA, Luchessi AD. (2020). Characterization of pomegranate peel extracts obtained using different solvents and their effects on cell cycle and apoptosis in leukemia cells. *Food Science and Nutrition* ; 8 : 5483–5496.
- Thangavelu A, Elavarasu S, Sundaram R, Kumar T, Rajendran D, Prem F. (2017). Ancient Seed for Modern Cure-Pomegranate Review of Therapeutic Applications in Periodontics. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* ; 9 : 11-14.
- Tiago JC, Paula RB, Cristina A, Jeimison DS, Júlio da S, Gustavo E, Ana PD, Rita CT, Francesc J. (2021). The homeostatic role of hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide in the vasculature. *Free Radical Biology and Medicine* ; 162 : 615-635.
- Trabelsi A, El Kaibi MA, Abbassi A, Horchani A, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. (2020). Phytochemical Study and Antibacterial and Antibiotic Modulation Activity of *Punica granatum* (Pomegranate) Leaves. *Scientifica*.
- Tsao R.(2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrient* ; 2 : 1231–1246.
- Tsimogiannis D, Oreopoulou V. (2019). Classification of Phenolic Compounds in Plants. In *Polyphenols in Plants*; Elsevier: Amsterdam,The Netherlands ; 263–284.
- Turkmen N, Sarı F, Velioglu YS. (2009). Factors Affecting Polyphenol Content and Composition of Fresh and Processed Tea Leaves. *AkademikGıda* ; 7 (Supp 6) : 29-40.
- United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2023). Available from: [https://fdc.nal.usda.gov/fdc\\_app.html#/food-details/169134/nutrients](https://fdc.nal.usda.gov/fdc_app.html#/food-details/169134/nutrients).
- Urbaniak A, Basta P, Ast K, Wołoszyn A, Kuriańska-Wołoszyn J, Latour E. (2018). The impact of supplementation with pomegranate fruit (*Punica granatum L.*) Juice on selected antioxidant parameters and markers of iron metabolism in rowers. *J Int Soc Sports Nutr* ; 15(Supp 1) : 35.
- Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MD, Mazur M, and Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* ; 39 : 44–84.
- Venkatasamy C, Zhao L, Zhang R, Pan Z. (2019). Pomegranate, in *Integrated Processing Technologies for food and agricultural products*, Z.Pan,R.Zhang,andS.Zicari,Eds.,ElsevierInc.
- Vinatoru M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* ; 8 : 303-313.
- Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* ; 9 : 635–654.
- Vučić V, Grabež M, Trchounian A, Arsić A. (2019). Composition and potential health benefits of pomegranate: A review. *Current Pharmaceutical Design* ; 25 : 1817–1827.
- Vuolo MM, Lima VS, Junior MRM. (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications* .33-50
- Wang J, Wu Z, Ma L, et Gu C. (2020). Complete chloroplast genome sequence of *Punica granatum* ‘Nana’ (Lythraceae) and phylogenetic analysis ; 5 : 2070-2071.
- Wu JQ., Kosten TR., Zhang XY. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* ; 46 : 200–206.
- Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrient* ; 10 : 1618.

## Références bibliographiques

Yan Z, Zhong Y, Duan Y, Chen Q, Li F. (2020). Antioxidant Mechanism of Tea Polyphenols and Its Impact on Health Benefits. *Animal Nutrition* ; 6 : 115–123.

Yanchev N, Ivanov I, Petkova NT, Delev D. (2022). Total Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts from *Sideritis scardica*. *Tropical Journal of Natural Product Research* ; 6 (Supp 7) : 1113-1118.

Yi J, Li S, Wang C, Cao N, Qu H, Cheng C, Wang Z, Wang L, Zhou L. (2019). Potential Applications of Polyphenols on MainNcRNAs Regulations as Novel Therapeutic Strategy for Cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* ; 13.

Yin H, Xu L, Porter N.A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews* ; 111, 10 : 5944-5972.

Zanotti I, Dall'Asta M, Mena P, Mele L, Bruni R, Ray S, et al. (2015). Atheroprotective effects of (poly) phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food and Function* ; 6 : 13-31.

## Résumé

La grenade (*Punica granatum*) est un fruit appartenant à la famille des punicaceae, connu depuis des siècles pour son utilisation en médecine traditionnelle à travers le monde entier. Sa partie comestible est aussi bien riche en substances bioactives que sa partie non comestible. Celle-ci est un sous-produit naturel issu principalement de l'industrie agro-alimentaire de la grenade. La présente étude a été réalisée sur trois extraits de pelure de grenade préparés par infusion (EI), macération (EM) et Soxhlet (ES).

Le principal objectif de ce travail est de valoriser la pelure de grenade par une quantification du contenu en composés phénoliques totaux puis par évaluation *in vitro* du potentiel antioxydant des différents extraits. D'abord, l'évaluation du contenu en polyphénols totaux a révélé que la teneur la plus élevée est contenue dans les deux extraits EM ( $302.05 \pm 3.51$  mg EAG/g) et ES ( $291.29 \pm 6.51$  mg EAG/g). Ensuite, l'évaluation de l'activité scavenger du  $H_2O_2$  a montré que, ES à 0.3 mg/ml présentait le pourcentage d'inhibition de l'oxydation le plus bas, soit  $65.15 \pm 3.63\%$ . Tandis que, le pourcentage le plus élevé a été obtenu avec EI à 1 mg/ml, atteignant  $82.36 \pm 1.50\%$ . Par ailleurs, l'effet scavenger du radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ) s'est avéré être dose-dépendant.

Le pourcentage le plus élevé (82%) de l'inhibition de l'oxydation du radical  $OH\cdot$  est obtenu par EI à 1 mg/ml. Concernant le monoxyde d'azote (NO), un taux de neutralisation minimal de  $59.49 \pm 1.46\%$  est obtenu par EM à 0.5 mg/ml, et un taux maximal de  $71.54 \pm 2.11\%$  par ES à 1 mg/ml. L'ensemble de ces résultats indique que les extraits de la pelure de grenade sont une source très riche de polyphénols et présentent un très bon potentiel antioxydant grâce à leur capacité neutralisant les espèces réactives  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$  et NO. L'utilisation de méthodes d'extraction optimisées serait donc prometteuse pour une meilleure valorisation de ce sous-produit naturel et son exploitation comme additif alimentaire ou en thérapie complémentaire.

**Mots-clés :** *Punica granatum*, pelure de grenade, méthodes d'extraction, polyphénols, activité antioxydante.

## Abstract

The pomegranate (*Punica granatum*) is a fruit belonging to the Punicaceae family, known for its use in traditional medicine for centuries throughout the world. Its edible part is as rich in bioactive molecules as its inedible part. The latter is a natural by-product derived mainly from the pomegranate food industry. The present study was conducted on three pomegranate peel extracts prepared by infusion (EI), maceration (EM) and Soxhlet (ES).

The aim of this study was to assess the value of pomegranate peel by evaluating the total phenolic compound content, followed by an *in vitro* analysis of the antioxidant potential of the various extracts. First, the assessment of the total polyphenol content demonstrated that the highest content was found in the EM ( $302.05 \pm 3.51$  mg EAG/g) and ES ( $291.29 \pm 6.51$  mg EAG/g) extracts. Then, the evaluation of  $H_2O_2$  scavenging activity showed that ES at 0.3 mg/ml presented the lowest percentage of oxidation inhibition, i.e.  $65.15 \pm 3.63\%$ , whereas the highest percentage was obtained with EI at 1 mg/ml, with  $82.36 \pm 1.50\%$ . Furthermore, the scavenger effect of the hydroxyl radical ( $OH\cdot$ ) was shown to be dose-dependent. The highest rate (82%) of inhibition of oxidation of the  $OH\cdot$  radical was obtained by EI at 1 mg/ml. Regarding nitric oxide (NO), a lowest neutralisation rate of  $59.49 \pm 1.46\%$  was recorded by EM at 0.5 mg/ml, and a highest rate of  $71.54 \pm 2.11\%$  was obtained by ES at 1 mg/ml.

Taken together, these results indicate that pomegranate peel extracts are a very high source of polyphenols and have very strong antioxidant potential through their scavenging activity of the  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$  and NO reactive species. The use of improved extraction methods would therefore be promising for enhancing the value of this natural by-product and making use of it as a food additive or for complementary therapy.

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