

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université A. Mira de Bejaia



Faculté de Technologie
Département de Génie des procédés
Laboratoire Génie des procédés

Mémoire
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
Master

Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés
Spécialité : Génie pharmaceutique

Présenté par

Azoug Tima

Drahmani Sabrina

Thème

Propriétés anti-oxydante et anti-bactérienne des extraits d'écorces du *Punica Granatum L.*
Préparation d'une forme pharmaceutique par microencapsulation par le procédé de simple
émulsion H/E.

Soutenue le 02/07/2024

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Affiliation	Qualité
M ^{me} Belhadj Nadra	MCB	Université de Béjaia	Présidente
M ^{me} Bouariche Zakia	MAA	Université de Béjaia	Examinatrice
M ^{me} Belkacemi Hayet	Professeur	Université de Béjaia	Encadrante

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions « ALLAH » qui nous a donné la patience, le courage, la santé et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Nous remercions très Chaleureusement **Mme H. BELKACEMI** pour son encadrement, son orientation, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous voulons vraiment vous remercier car nous avons beaucoup de chance de vous avoir comme directrice de mémoire.

Nos vifs remerciements vont spécialement au membre de jury, pour l'honneur qu'ils ont fait en acceptant de juger ce modeste travail : **Mme N. BELHADJ et Mme Z. BOUARICHE.**

Nous tenons à remercier vivement **Professeur T. Abdelaziz**, pour son aide qui nous a été très précieuse pour la réalisation de la partie microbiologique au sein de son laboratoire de Microbiologie du bloc 9 de l'université de Bejaia.

Un grand merci à **Mme Y. AMRANI**, Ingénieur du laboratoire pharmaceutique N°2 du bloc 11 de l'Université de Bejaïa, pour sa précieuse aide, sa disponibilité et pour ses encouragements durant la réalisation de notre mémoire.

Merci à tous les responsables de laboratoire de Génie des procédés du bloc 11 plus précisément **Mme K. ADRAR, Mme M. ADRAR** ainsi que **Mme BARADAI** pour leurs aimables contributions qui ont permis à l'aboutissement de notre travail.

Nos remerciements vont également à tous nos enseignants durant nos années d'études. Enfin nous exprimons notre immense gratitude à nos chères familles sans exception du plus vieux au plus jeune ainsi qu'à tous nos amis et à toute personne qui ont pu nous apporter des encouragements ou du réconfort durant notre parcours étudiantin.

Tima & Sabrina

Dédicace

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

*A mes très chers parents adorés (**Amare et Djida**), aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut vos efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon épanouissement. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.*

*A la personne qui m'a soutenu sans relâche, m'a aimé sans condition, mon **future mariée "S"** ton amour et t'a présence rassurante m'ont donné la force pour aller jusqu'au bout, ce mémoire et dédie à toi, avec toute ma reconnaissance et mon affection.*

*A mes chers frères (**Hocine et Mohammad**) et sœurs (**Sabrina, Besma et Sabah**) et mes cousines je leurs souhaite beaucoup de réussite, de bonheur et de bonne santé. Je les remercie de tout le soutien, et l'aide qu'ils m'ont apporté.*

*A mes deux chers **grands parents**, Mes **oncle et tante** paternel et maternel que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez pas cessé de formuler durant vos prières. Que dieu vous préserve santé et longue vie.,*

*A ma binôme **Drahmani Sabrina** pour la complicité, le partage et tout le vécu que nous avons enduré et surmonté ensemble.*

*A toutes les amies surtout **Hassina Taarkoubet et Tinhinane bazize***

A l'ensemble de mes enseignants A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin. A mes adorables amis, mes camarades, et tous ceux qui ont vécu avec moi les instants les plus difficiles durant ce travail.

Tima

Dédicace

Je dédie ce modeste travail qui n'aurait pu aboutir sans l'aide de Dieu

À toutes les personnes que j'aime :

À la lumière de ma vie, la flamme de mon chemin à celle qui m'a encouragé tout au long du parcours de mes études, à celle qui fait de moi une bonne personne dans ce monde, que Dieu te protège et te procure la bonne santé, ma très chère mère : **KATTEM TASSADIT**

À l'homme le plus pur, tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Merci pour tout l'amour que tu m'as donné durant mon enfance et que tu continues de m'apporter chaque jour, mon très cher

père : **ABD EL HAKIME**

À Mes chères sœurs : **SALIMA, NASSIMA**

À Mes chères frères : **SALIME, FARES, KASSA.**

À Mes chères sœurs : **SALIMA, NASSIMA**

À Ma binôme : **AZOUG TIMA**

À mes amies : **MANEL, IBTISSAME.**

En fin À Mon homme **KHALEF DEBABI**

Sabrina



Listes des abréviations

AG : Acide gallique

AE : Acide ellagique

DCM : Dichlorométhane

Dex : Dextrine

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EBEG : Extrait brut d'écorce de grenade

EEG : Extrait d'écorce de grenade

EEP% : taux encapsulation polyphénols

EEF% : taux encapsulation flavonoïdes

EEGA : Extrait d'écorce de grenade Hydroalcoolique

EGDCM : Extrait de grenade dichlorométhane

EP : Éther de pétrole

H/E : Huile/ Eau

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IR : Infrarouge

MeOH : Méthanol

MEG : Microsphère d'écorce de grenade

Mg Eq AG/ g Ex Sec : Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec

Mg Eq Q / g Ex Sec : Milligramme quercétine par gramme d'extrait sec

PA : Principe actif

PEG : Le polyéthylène glycol

Qr : Quercétine

Tr : Temps de rétention

TPPNa : Tripolyphosphate de sodium

UV : spectrophotomètre UV-visible

Listes des figures

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur le grenadier

Numéro	Titres des figures	Page
Figure I. 1	Punica Granatum	3
Figure I. 2	Répartition géographique de la grenade dans le monde	4
Figure I. 3	Les parties de punica granatum	7
Figure I. 4	Structure de base des flavonoïdes	13
Figure I. 5	Structure de l'acide gallique et l'acide ellagique	14
Figure I. 6	Structure des tanins hydrolysables	14
Figure I. 7	Structure des tanins condensés	15
Figure I. 8	Cellule unique de Escherichia coli adhérant à des cellules CACO-2 de 19 jours, observée au microscope électronique à balayage (SEM)	17

Chapitre II : La microencapsulation et la cinétique de libération de principe actif

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure II.1	Différent système de microparticules	23
Figure II.2	Présentation des profils de libération prolongé et immédiate	24
Figure II.3	Les différents profils de libération des Pas	25
Figure II.4	Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC	26
Figure II.5	HPLC	26
Figure II.6	Plan de Box-Behnken pour trois facteurs	28

Chapitre III : Matérielle et méthodes

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure III.1	Ecorce sèche de punica granatum	29
Figure III.2	Broyeur et un mortier en porcelaine utilisé pour le broyage	30
Figure III.3	La poudre avant et après tamisage dans le tamiseur et dans une balance analytique de précision	30

Figure III.4	Procédure de macération	31
Figure III.5	EBEG avant et après filtration	31
Figure III. 6	Extraction par l'éther de pétrole	32
Figure III.7	Extraction par Dichlorométhane	33
Figure III.8	Résultat de l'extraction liquide-liquide	33
Figure III.9	Schéma de réaction des flavonoïdes avec chlorure d'aluminium	35
Figure III.10	Représente la réaction chimique entre le radical DPPH violet et l'antioxydant jaune	37
Figure III.11	La phase dispersée	41
Figure III.12	La phase continue	41
Figure III.13	Mélange de deux phases	42
Figure III.14	Processus de filtration	42
Figure III.15	La poudre après séchage de filtrats	42
Figure III. 16	Les microsphère obtenu	42
Figure.III.17	Schéma de dosage des essais de l'encapsulation de l'écorce de grenade	43
Figure.III.18	Schéma de dosage des flavonoïdes essais de l'encapsulation de l'écorce de grenade	43
Figure III. 19	Principe de la méthode de diffusion sur disques	44
Figure III. 20	Méthode des puits	45
Figure III.21	Mueller-Hinton sous forme solide	45
Figure III. 22	Préparation de milieux physiologique	46
Figure III. 23	Présentation de méthode des puis et méthode des disques Respectivement	46
Figure III.24	Procédure d'ensemencement	47
Figure III.25	Les excipients utilisés pour la formulation de la pommade	48
Figure III.26	Préparation de la pommade EBEG	48
Figure III.27	Pommade EBEG	48
Figure III.28	Pommade des microsphères au cours de préparation	49
Figure III.29	Pommade des microsphères préparé	49
Figure III.30	Préparation de la pommade témoin	50
Figure III.31	Pommade témoin préparé	50

Figure III.32	Milieu physiologique étalonné à PH =5.8	51
Figure III.33	Installation du dissolu test mise en œuvre pour l'étude de la cinétique de Libération	52
Figure III.34	Avant et après dissolution des microsphères	52
Figure III.35	Avant et après dissolution de la pommade EBEG	52
Figure III.36	Avant et après dissolution de la pommade à base des microsphères	52
Figure III.37	Schéma de la procédure de préparation des pastilles	53
Figure III.38	Microscope optique	54

Chapitre IV : Résultats et discussion

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure IV.1	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	56
Figure IV.2	Histogramme des teneurs de polyphénols totaux des différents extraits d'écorces de grenade (<i>Punica Granatum</i>)	57
Figure IV. 3	Courbe de dosage des flavonoïdes totaux	58
Figure IV.4	Histogramme de variation des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits d'écorces de <i>Punica Granatum</i>	58
Figure IV.5	Histogramme de l'activité antioxydante et pouvoir d'inhibition du DPPH° par les extraits d'écorce de grenade (<i>Punica Granatum</i>)	60
Figure IV.6	Chromatogramme par HPLC de EBEG	63
Figure IV.7	Chromatogramme par HPLC de DCMEG	63
Figure IV.8	Chromatogrammes par HPLC de EEPEG	64
Figure IV.9	Diagramme de Pareto des effets des termes sur EEP%	68
Figure IV.10	Diagramme des effets des facteurs sur la réponse EEP	69
Figure IV.11	Les graphes des résidus	70
Figure IV.12	Diagrammes Surfaces –Réponses ou contours pour EEP%	71
Figure IV.13	La courbe valeur prédite du taux d'encapsulation EEP%	73
Figure IV. 14	Diagramme de Pareto des effets pour EEf %	75
Figure IV.15	Diagramme des effets des facteurs sur la réponse EEf%	75
Figure IV.16	Les graphes des résidus pour la réponse Y2 (EEf%)	76

Figure IV.17	Diagrammes Surfaces –Réponses ou contours pour EEf%	77
Figure IV.18	La courbe valeur prédite du taux d'encapsulation EEf%	79
Figure IV.19	Cinétiques de la libération des polyphénols	81
Figure IV.20	Spectres IRFT de l'Acide gallique, de la Quercétine et de l'extrait brut de <i>Punica Granatum</i> (EBEG)	83
Figure IV.21	Spectres IRFT des microsphères de l'extrait des trois essais MEG4, MEG6 et MEG9 en fonction du pH	83
Figure IV. 22	Spectres IRFT de la dextrine, du PEG, de l'extrait brut et des microsphères de l'extrait de l'essai 6 (EGM6)	84
Figure IV. 23	Spectres IRFT de la poudre de l'écorce et de l'extrait de <i>Punica Granatum</i>	84
Figure IV.24	Zones d'inhibition des microsphères par la méthode des puits, EBEG par la méthode des puits et des disques respectivement sur la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Figure IV.25	Zones d'inhibition des microsphères par la méthode des puits, EBEG par la méthode des puits et des disques respectivement contre la bactérie <i>Escherichia coli</i>	87
Figure IV.26	Témoin de bactérie <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> respectivement	88
Figure IV.27	Zones d'inhibition de pommade de EBEG et pommade de microsphère contre la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode des disques et des puits	88
Figure IV.28	Zones d'inhibition de pommade de EBEG et pommade de microsphère contre la bactérie <i>Escherichia coli</i> par la méthode des disques et des puits	88
Figure IV.29 :	Témoin de bactérie <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> respectivement. AT : antibiotique. A : Alcool. P : Pommade témoin	89
Figure IV.30	Images des microsphères MEG4, MEG6 et MEG9 avec un grossissement x100	91
Figure IV.31	Images des microsphères MEG4, ME6 et MEG9 avec un grossissement x4	91
Figure IV.32	Image des microsphères MEG6 avec un grossissement x1000	92



Listes des tableaux

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur la plante *Punica granatum* L

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau I. 1	Production de grenade en Algérie (DSA 2019)	5
Tableau I. 2	Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie	5
Tableau I.3	Classification de la grenade (Anonyme, 2010)	6

Chapitre II : La microencapsulation et la cinétique de libération de principe actif

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau II. 1	Formes galéniques des médicaments	19
Tableau II.2	Classification des techniques d'encapsulation selon la nature du procédé	22

Chapitre III : Matériels et méthodes

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau III.1	Les dilutions de la solution mère d'AG	34
Tableau III.2	Les dilutions de la solution mère de quercétine.	36
Tableau III.3	Variables codées et réelles des facteurs	40
Tableau III.4	Matrice du plan d'expérience factoriel pour les essais de microencapsulation de l'extrait brut de l'écorce de grenade	40
Tableau III.5	Temps et le volume de la cinétique de libération de principe actif.	51

**Chapitre IV : Résultats et discussion**

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau IV.1	Couleurs et rendements massiques des extraits d'écorce de grenade.	55
Tableau IV.2	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° dans les extraits des écorces de <i>Punica Granatum</i>	59
Tableau IV.3	Les temps de rétention et aires des pics chromatographiques des standards par HPLC	61
Tableau IV.4	Temps de rétention et les aires des pics des métabolites secondaires identifiés dans les extraits par HPLC.	61
Tableau IV.5	Concentration en polyphénols des extraits d'écorce de grenade par HPLC.	62
Tableau IV.6	Concentration en flavonoïdes des extraits d'écorce de grenade par HPLC	62
Tableau IV.7	Plan factoriel à 2 niveaux, 3 facteurs -2 réponses et taux d'encapsulation en polyphénols et en flavonoïdes des microparticules obtenues par simple émulsion H/E.	65
Tableau IV.8	Analyse statistique de la variance pour la réponse EEP%.	67
Tableau IV.9	Analyse statistique de la variance pour la réponse EEF%.	73
Tableau IV.10	Taux de libération des polyphénols des microsphères EGM6 de l'extrait brut de <i>Punica Granatum</i> dans Dextrine / PEG, des pommades PEGM6 et PEGEB dans le tampon à pH= 5.8 en fonction du temps.	80
Tableau IV.11	Bandes d'absorption IR des liaisons chimiques caractéristiques de composés identifiés dans EBEG, MEG4, MEG6, MEG9 rapport aux standards et des réactifs de microencapsulation	85
Tableau IV.12	Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes formulations et extrait brut testés vis-à-vis des souches bactériennes.	89

Sommaire



Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique sur le grenadier.	
I. Généralités sur la plante <i>Punica Granatum</i> L	3
I.1. Introduction	3
I.2. Présentation du grenadier.....	3
I.3. Origine et distribution géographique	4
I.3.1. Production de grenade au monde	4
I.3.2. Production de grenade en Algérie	4
I.4. Variétés de grenadier	5
I.5. Classification botanique	6
I.6. Caractères morphologiques	6
I.6.1. Les feuilles	6
I.6.2. Les Fleurs	6
I.6.3. Le fruit	7
I.6.4. La Racine	7
I.6.5. L'Ecorce.....	8
I.7. Composition chimique et phytochimique.....	8
I.7.1. Les feuilles.....	8
I.7.2. Les fleurs.....	8
I.7.3. Jus de grenade	8
I.7.4. Graine	9
I.7.5. Ecorce de fruit.....	9
I.8. Généralités sur les métabolites.....	9



I.8.1. Métabolites primaires	10
I.8.2. Métabolites secondaires.....	10
II.8.2.1. Classification des métabolites secondaires	10
I.8.2.1.1. Les alcaloïdes	10
I.8.2.1.2. Les terpènes	11
I.8.2.1.3. Les composés phénoliques	12
a. Acides phénoliques	12
b. Les flavonoïdes	12
c. Les tanins	13
d. Les coumarines	15
I.9. Les activités biologiques de la grenade	16
I.9.1. L'activité antimicrobienne	16
I.9.2. Activité antioxydante	18
I.10. Les principales méthodes d'extraction.....	18

Chapitre II : La microencapsulation et la cinétique de libération du principe actif

II.1. Généralités sur les médicaments

II.1.1. Définition	19
II.1.2. Formes galéniques	19
II.1.2.1. Pommade	19
II.1.2.1. 1.Définition	19
II.1.2.1.2. Intérêts thérapeutiques des pommades	20
II.1.3. Définition des principes actifs	20



II.1.4. Excipients	20
II.2. Généralités sur l'encapsulation	20
II.2.1. Définition de l'encapsulation	20
II.2.2. Intérêt de l'encapsulation	21
II.2.3. Les différents procédés d'encapsulation	21
II.2.4. Type des microparticules	23
II.3. Généralités sur la pharmacocinétique	23
II.3.1. Définition	23
II.3.2. Les modèles cinétiques de libération des PA	24
II.3.2.1. Libération prolongée	24
II.3.2.2. La libération répétée	24
II.3.2.3. La libération retardée	25
II.3.2.4. La libération séquentielle	25
II.4. Les techniques d'analyse	25
II.4.1. Principe de la HPLC	25
II.4.2. Appareillage	26
II.4.2. L'infrarouge	27
II.4.3. La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible	27
II.5. Les plans d'expériences	27
II.5.1. Définition	27
II.5.2. Les types de plan d'expérience	27
II.5.2.1. Plans factoriels complets	27
II.5.2.2. Plan composite centré	28



II.5.2.3. Plans de Box-Behnken28

Chapitre III : Matériels et méthodes

III.1. Les échantillons29

III.1.1. Préparation des échantillons29

III.2. Extraction des composés phénoliques et flavonoïdes de l'écorce de Grenade30

III.2.1. Extraction par macération dans le méthanol aqueux (extraction solide/liquide)31

III.2.2. Extraction par solvant (Extraction liquide / liquide)32

 a. Extraction par l'éther de pétrole (EEP)32

 b. Extraction par Dichlorométhane32

III.2.3. Analyse quantitative par spectroscopie UV-visible33

 a. Dosage des polyphénols33

 b. Dosage des flavonoïdes.....35

III.3. Activité antioxydante par la méthode de DPPH36

III.4. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC38

III.5. Micro encapsulation39

III.5.1. Les matières premières utilisées39

III.5.2. Optimisation des paramètres de préparation des microparticules40

III.5.3. Protocole expérimentale pour la micro encapsulation41

III.5.4 : Techniques de caractérisation42

III.5.4.1. Essais de caractérisation par le spectrophotomètre UV visible42

III.5.4.2. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC
.....43

III.6. Activité antibactérienne44

III.7. Formulation de la pommade47



III.7.1. Composition chimique et rôle des constituants de la pommade	47
III.7.2. Activité antibactérienne des pommades	50
III.8. Etude de la cinétique de libération	50
III.8.2. Préparation du milieu physiologique	50
III.9. Caractérisation par infrarouge IRFT	53
III.10. Observation microscopique	54

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Extraction.....	55
IV.1.1. Rendement massique des extraits	55
IV.2. Etude phytochimique	56
IV.2.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible	56
IV.2.1.1 Dosage des polyphénols totaux	56
IV.2.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	58
IV.2.2. Activité antioxydante par la méthode de DPPH°.....	59
IV.3. Caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	61
IV.4. La microencapsulation	65
IV.4.1. Réalisation des essais et analyse statistique	65
IV.4.1.1. Utilisation de logiciel MINITAB	66
IV.4.1.2. Taux d'encapsulation en polyphénols EEP%	66
a. Analyse de la variance et équation du modèle pour EEP %	67
b. Diagramme de Pareto pour EEP%	68
c. Diagrammes des effets des facteurs sur la réponse EEP%	69
d. Optimisation de résidus de la réponse EEP%	69



e. Diagrammes des surface-réponse RSM pour EEP%	71
f. Graphe de Prédiction.....	72
IV.4.1.3. Taux d'encapsulation en flavonoïdes EEF%	73
a. Analyse de la variance et équation du modèle pour EEF %	73
b. Diagramme de Pareto pour EEF%	74
c. Diagramme des effets des facteurs sur la réponse EEF%	75
d. Optimisation de la réponse EEF%	76
e. Diagrammes des surface-réponse RSM pour EEF%	77
f. Graphe de Prédiction	78
IV.5. Etude de la cinétique de libération in vitro des principes actifs de l'extrait de <i>Punica Granatum</i> encapsulés dans les microparticules de PEG / Dextrine	79
IV.5.1. Profil de libération dans le milieu dermique	79
IV. 6. Caractérisation par IRFT	82
IV.7. Résultats de l'activité antibactérienne	87
IV.8. Observations microscopiques	91
Conclusion et perspectives.....	93
Références Bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

Introduction

Les plantes médicinales jouent aujourd'hui un rôle crucial, car ces derniers temps la phytothérapie est devenue de plus en plus répandue dans le monde pour plusieurs raisons, la méfiance envers les produits chimiques et le désir de réduire la consommation de médicaments synthétiques et leur effets secondaires. La recherche scientifique soutient l'efficacité des plantes médicinales ce qui renforce la crédibilité de la phytothérapie. Accessibilité de ces plantes médicinales et leur prix abordable par rapport aux médicaments pharmaceutiques, de plus depuis quelque temps les plantes médicinales ont été reconnues et réglementées par les autorités sanitaires, ce qui augmente leur utilisation.

Dans plusieurs régions d'Afrique, les plantes médicinales représentent pratiquement le seul arsenal thérapeutique, à disposition des guérisseurs traditionnels qui soignent dans certains cas plus de 90% de la population. Il est donc indispensable d'étudier ces plantes et de donner une base scientifique pour leur utilisation sécurisée [1]. Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent en premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroissent et présentent des inconvénients pour la santé [2].

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs, et d'autre part pour le besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires notoires [3].

Le grenadier (*Punica granatum L.*) est une plante aux multiples vertus thérapeutiques utilisée dans différents pays. L'étude de cette espèce végétale suscite actuellement un grand intérêt, où divers extraits de son jus, de ses graines, de son écorce et de ses fruits entiers sont utilisés [4].

La grenade a une grande valeur nutritionnelle, c'est une source importante en minéraux, vitamines et en composés bioactifs. Elle a été employée dans la médecine traditionnelle, historiquement pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires, par la plupart des parties du fruit qui sont connues pour leur important potentiel antioxydant. Il existe une liste impressionnante de cibles potentielles de maladies, comme les maladies coronariennes, les cancers (peau, sein, prostate et colon), l'inflammation, l'hyperlipidémie, le diabète, les troubles cardiaques, les troubles hormonaux, l'hypoxie, l'ischémie, le vieillissement, les troubles neurologiques et le SIDA, où les effets thérapeutiques de la grenade ont été prouvés par des études *in vitro* ou *in vivo* [5].

L'objectif principal de ce travail est de réaliser une étude actualisée sur les propriétés anti-oxydante et antibactérienne des extraits d'écorces du *Punica Granatum L* et ainsi préparation d'une forme pharmaceutique par microencapsulation à simple émulsion H/E. Ce mémoire est subdivisé en deux parties : une partie bibliographique et une autre expérimentale :

➤ Partie bibliographique scindée en deux chapitres :

-Le premier chapitre est principalement consacré aux concepts généraux sur le grenadier, les composés phénoliques de l'écorce de grenade et finalement quelques notions sur l'activités anti-oxydante et antibactérienne.

- Le deuxième chapitre est consacré aux rappels sur les procédés de microencapsulation et sur la cinétique de libération des principes actifs.

➤ Partie expérimentale

-Le troisième chapitre présente les matières premières et les méthodes utilisées pour l'extraction des principes actifs, la micro encapsulation par simple émulsion par la méthodologie des plans d'expérience, l'étude de l'activité anti-bactérienne des différentes formulations des microsphères et des pommades préparées avec ces dernières, ainsi que l'étude de la cinétique de libération du principe actif des préparations dans un milieu physiologique dermique.

- Le quatrième chapitre rassemble les résultats essentiels et leurs discussions.

Enfin, le mémoire est terminé par une conclusion et des perspectives.

Synthèse Bibliographique

➤ *Chapitre I*

*Synthèses bibliographiques sur la plante *Punica granatum L**

➤ *Chapitre II*

La microencapsulation et la cinétique de la libération du principe actif

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur le grenadier

I. Généralités sur la plante *Punica Granatum L*

I.1. Introduction :

Les médicaments à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'étude ethnobotanique des plantes. L'Afrique dispose d'une diversité importante de plantes médicinales. Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la grande majorité des populations rurales en Afrique, où plus de 80% de cette population s'en sert pour assurer les soins de santé [6]. Les plants médicinaux ou bien selon la pharmacopée européenne les drogues végétales sont des plants ou des parties du plant (racine, fleur, feuille...etc.) possèdent des propriétés préventive et curative contre certaine maladie.

I.2. Présentation du grenadier :

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6m de haut. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre [7].

Il est depuis longtemps cultivé pour un but-ornemental et pour ses fruits comestibles. Ses fruits contiennent de nombreuses graines, chacun enrobé dans une pulpe gélatineuse rouge cramoisi, le tout enveloppé dans une peau (écorce) coriace dont la couleur peut aller du jaune au rouge foncé. Depuis des milliers d'années, les propriétés astringentes de l'écorce du fruit et de l'arbre sont très prisées en médecine, particulièrement comme vermifuge [8] (Figure I.1).



Figure I. 1 : *Punica Granatum* [9].

I.3. Origine et distribution géographique :

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontanée depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant JC [10].

La grenade est distribuée dans des zones géographiques tempérées chaudes et tropicales, elle se trouve dans la zone méditerranéenne dont l'Algérie, la Tunisie, le Maroc, l'Espagne, et rarement trouvée dans le sud de la France ainsi que l'Italie et la Grèce, ainsi que dans le sud des États-Unis, l'Argentine, le Chili, la Chine, le Proche-Orient ainsi qu'en Suisse exactement dans Genève et Valais (Figure I.2).

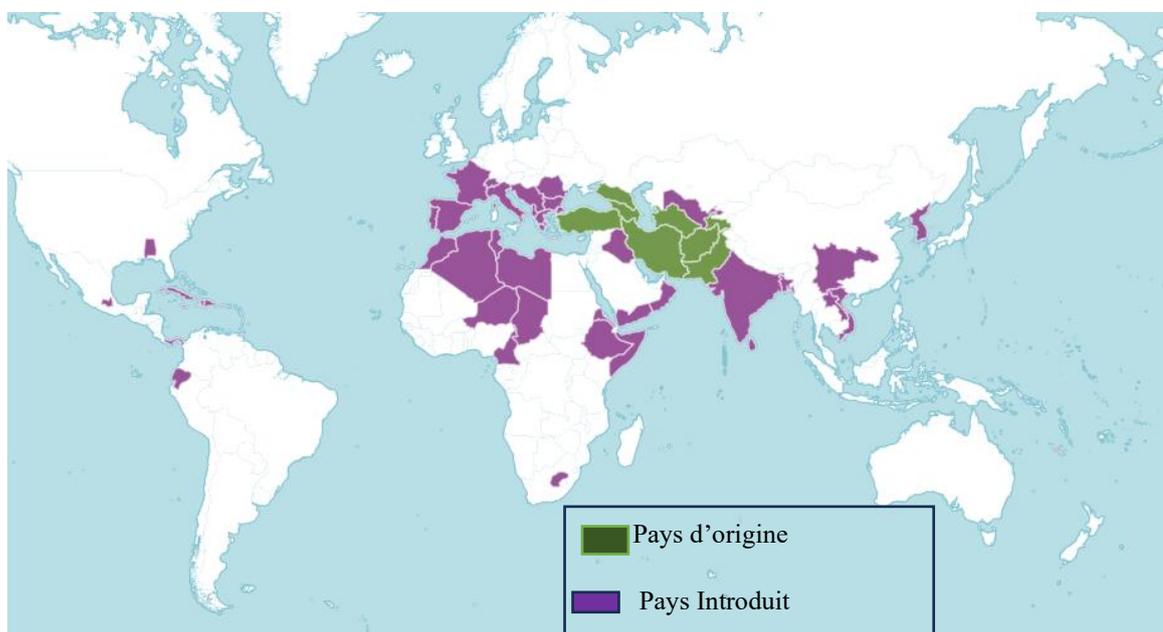


Figure I. 2 : Répartition géographique de la grenade dans le monde [11].

I.3.1. Production de grenade au monde :

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000 Ha, dont plus de 76 % sont répartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA). Cependant, l'Espagne, l'Égypte et ont une

superficie comprise entre 16 000 et 2400 ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés [12].

I.3.2. Production de grenade en Algérie :

La production de la grenade en Algérie ainsi que sa superficie et rendement sont enregistrées dans le **Tableau I.1.**

Tableau I. 1 : Production de grenade en Algérie (DSA 2019) [13].

Ville	Superficie plantée (ha)	Production (qx)	Rdt (qx/ha)
Mostaganem	1262	258623	227.4
Tiaret	443	13500	36.5
Tlemcen	532	5400	135
Relizane	516	67765	141.2
Bejaia	125	9282	85.1

I.4. Variétés de grenadier :

Les critères les plus utilisés pour les distinguer sont la taille du fruit, la couleur de l'écorce, la couleur des graines, la dureté des pépins, la teneur en jus, acidité et astringence et la période maturation [14]. Il existe un grand nombre de variétés de grenades qui ne se différencient pas seulement par leur morphologie, mais aussi par leur composition physicochimique, en particulier par leur teneur en sucre, en acide, vitamine C, en polyphénols et leur rendement en jus. Selon cette composition en sucre et en acide, les variétés sont souvent réparties en grenades aigres, aigres-douces et douces [15]. Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualité s très différentes. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petites jardins en Kabylie, on ne connaît que leur appellation locale (Lahlou, Elmouze,...). Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat (tableau 02) [16].

Tableau I. 2 : Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie [17].

Variétés de grenadier commercialisées en Algérie		
Messaad	Corde travita	Doux de Kolea
Gajin	Sefri	Zemdautomne

Spanish duoy	Chelfi	Moller huesso
Mellisse	Sulfani	
Espagne rouge	Papers shell	

I.5. Classification botanique :

D'après la classification de **Linné (1753)** qui a été modifiée en 2003, la classification de *Punica Granatum* est comme suit :

Tableau I. 3 : Classification de la grenade (Anonyme, 2010) [18].

Règne	<i>Plantae</i> – Plantes
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i> – Plantes vasculaires
Super-division	<i>Spermatophyta</i> – Plantes à graines
Division	<i>Magnoliophyta</i> – Plantes à Fleurs
Classe	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotylédones
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Lythraceae</i>
Genre	<i>Punica</i> L.
Espèce	<i>Punica Granatum</i> L

I.6. Caractères morphologiques :

I.6.1. Les feuille :

Les feuilles du grenadier sont caduques, opposées, et disposées sur les rejets comme ils peuvent être en touffes sur les pousses courtes, glabres sur les deux faces. Caractérisées par la couleur vert foncé de la face supérieure et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante [19]. Ces feuilles entières, brillantes, lancéolées, assez coriaces, présentent un limbe elliptique allongé, de 3 à 8 cm de long. De sommet obtus ou allongé, munies d'un court pétiole rougeâtre [20].

I.6.2. Fleure :

Le grenadier est monoïque, c'est-à-dire qu'il porte sur un même plant des fleurs mâles (qui produisent le pollen) et des fleurs femelles (celles qui donneront les fruits). Les fleurs sont solitaires, d'un rouge vif, à 3-7 pétales, épaisses et grandes. Les fleurs femelles sont plus grandes, en forme de cruche et longistylées. Les fleurs mâles sont plus petites, campanulées et brevistylées [21].

I.6.3. Le fruit :

Le fruit du grenadier, la grenade, est une baie ronde, cortiquée, c'est-à-dire à épicarpe cutinisé et dur, de la taille d'une pomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre [16], de couleur rouge vif ou jaune foncé et claire marbré des fois de rouge selon les différentes variétés de grenade. Le fruit du grenadier enveloppe des centaines des graines placées dans des compartiments, séparées par des cloisons ténues et membraneuses. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit [22]. Les graines, au tégument externe pulpeux et très succulent, possèdent un tégument interne dur et coriace. Ces multiples graines, courtement funiculées, deviennent plus ou moins anguleuses par compression réciproque [23] (Figure I.3).

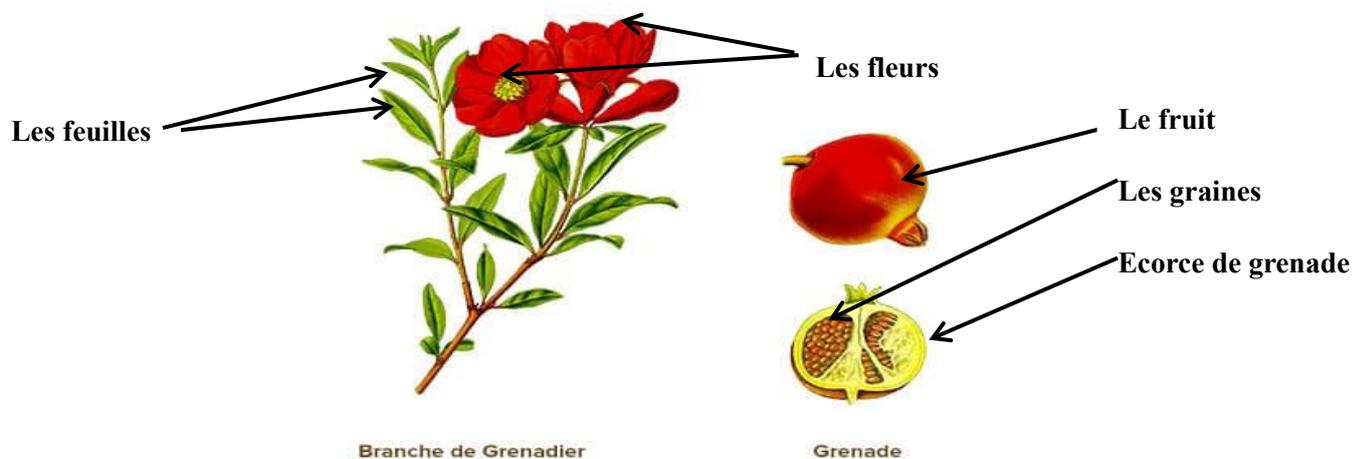


Figure I. 3 : les parties de punica granatum [24].

I.6.4. Racine :

Le système racinaire du grenadier, d'une surface d'environ 60cm², a la capacité à s'adapter selon les conditions de sol. Il est fasciculé et dispose d'une racine ligneuse, noueuse, dure et pesante [25].

I.6.5. Ecorce :**a. Ecorce de fruits :**

L'écorce de la grenade est la partie dure du fruit. Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtres sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente [26].

b. Ecorce de racine :

L'écorce de la racine se présente sous forme de fragments irréguliers, plus ou moins enroulés ou cintrés, d'un millimètre d'épaisseur environ. La face interne de l'écorce de la racine est jaune verdâtre est lisse et finement striée longitudinalement. La face externe est gris jaunâtre ou brunâtre. Elle montre de larges écailles subéreuses, des rides ou de larges fissures [27].

I.7. Composition chimique et phytochimique :**I.7.1. Les feuilles :**

Les feuilles du grenadier renferment des flavones, telles que la lutéoline et l'apigénine. Cette dernière posséderait des propriétés anxiolytiques. Elles contiennent également des tanins, comme la punicaline et la punicalagine [28].

I.7.2. Les fleurs :

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique [29].

I.7.3. Jus de grenade :

Le jus de grenade, comme de nombreux autres jus de fruits, se compose de sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose et d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide ascorbique, l'acide gallique et l'acide ellagique [29], ainsi que d'acides aminés comme la valine, proline et méthionine. Il contient aussi des flavanols et des indole-amines comme la tryptamine, la sérotonine, neuromédiateur et thocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades [30].

I.7.4. Graine :

L'huile obtenue à partir des graines de grenade (12 à 20% du poids des pépins) est composée à plus de 95% de triglycérides, eux-mêmes constitués majoritairement (>70%) d'un acide gras conjugué de l'acide linoléique (CLnA) : l'acide punique (C 18:3 - 9cis, 11trans, 13cis). Le deuxième

acide gras majoritaire est l'acide linoléique, puis on trouve les acides oléique, palmitique et stéarique en quantité très minoritaire [30]. Il a été mis en évidence l'existence d'hormones stéroïdiennes dans les graines de grenade. L'huile contient aussi des composés mineurs tels que des tocophérols, stérols, stéroïdes, et cérébrosides. Les pépins, sont composés d'une matrice rigide dont la composition est bien moins décrite. Elle comporte en majorité des lignines ($\approx 35,3\%$), des protéines ($\approx 13,2\%$), des pectines ($\approx 6\%$), des sucres [28].

I.7.5. Ecorce de fruit :

La peau de la grenade est composée à 80% d'eau, de polysaccharides complexes ($\approx 8\%$), dont des polysaccharides solubles ($\approx 5\%$), représentés par des pectines et de l'hémicellulose. Elle contient aussi des minéraux, dont le potassium, calcium, magnésium, phosphore et sodium. [31] L'écorce du fruit est très riche en flavonoïdes et en tanins [28], Il contient environ 25% d'ellagitanins tels que la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la granatine B, et des flavonoïdes tels que : lutéoline, quercétine et punicalin, spécifiques à la grenade [32].

L'écorce du fruit contient également deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide éllagique, elle renferme aussi des mol de nombreux ellagitanins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la granatine B. écules sa coloration jaunes et anthocyanidine ; responsables de la couleur rouge des grenades. L'écorce de grenade se compose également, d'acide gras, de catéchines, de quercétines et de rutines [33].

I.8. Généralités sur les métabolites :

Au travers âges ,l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir a ses besoins de base :nourriture, abris ,vêtement et également pour ses besoins médicaux ;les organismes vivants (plantes, organismes marins ,bactéries,...)contiennent de nombreux métabolites de structure variées ,dont la fonction biochimique n'est pas toujours connue ,les métabolites ont diverses fonctions, y compris l'énergie ,la structure ,la signalisation ,un stimulant et des effets inhibiteurs sur les enzymes :ils sont les produits intermédiaires du métabolisme [34]. Dans le métabolisme de la plante, on trouve deux types de métabolites : primaire et secondaire.

I.8.1. Un Métabolite primaires :

Est présent dans de nombreux organismes. Il est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme [35].

I.8.2. Un Métabolites secondaires :

Appartiennent à des groupes chimiques. La notion de « métabolite secondaire » résultait initialement de trois groupes d'observations : d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie de la plante, ensuite une répartition très inégale selon les végétaux. Ils sont des molécules organiques complexe synthétisées en petites quantités par les plantes autotrophène. Donc, ces produits sont très dispersés et très différents selon les espèces. Les métabolites secondaires ne sont pas directement impliqués dans le processus de croissance et de développement mais Ils jouer un rôle dans les relations entre les plantes et leur environnement, leurs interactions plantes-animaux et dans la défense contre les herbivores, les prédateurs et les pathogènes, comme agents allopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation. Ces molécules constituent un groupe de produits qui sont explorés pour des propriétés très divers : antioxydants, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antifongiques, analgésique ... etc. Qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines de la pharmacologie ou de l'agroalimentaire [36].

II.8.2.1. Classification des métabolites secondaires :

La classification des métabolites secondaires est basée sur : la structure chimique, la composition, leur solubilité dans divers solvants ou leur voie de synthèse. Le système de classification principal comprend trois grandes classes :

- Les alcaloïdes.
- Les terpènes.
- Les composés phénoliques.

Pour chaque classe nous trouvons des sous-classes avec une complexité dans la structure. [37]

I.8.2.1.1. Les alcaloïdes :

Un alcaloïde est un composé organique naturel, hétérocyclique et comprend une base d'azote, plus ou moins basique, de structure moléculaire complexe et doué de propriétés pharmacologiques prononcées même à faible dose. La plupart des alcaloïdes sont très toxiques à fort dose [38]. Les alcaloïdes sont principalement extraits des plantes fleurissantes, mais on les trouve également chez quelques animaux comme les fourmis, les grenouilles et les coccinelles [39]. Ils sont utilisés comme agents anti-cancéreux, antipaludéens et antiarythmiques [40]. On estime que les plantes produisent environ 12 000 alcaloïdes différents. [41]. Il existe généralement 3 types :

- **Les proto-alcaloïdes** : l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils sont élaborés à partir d'acides aminés. Exemple : Colchicine.

- **Les pseudo-alcaloïdes** : Ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés. Exemple : Caféine.
- **Les alcaloïdes vrais** : Ils comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique et sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé, ils possèdent une activité pharmacologique marquée [42].

I.8.2.1.2. Les terpènes :

Les terpènes (Terpénoïdes) représentent la plus grande classe de composés organiques naturels avec plus de 40 000 structures signalées à ce jour. Sa structure chimique de base est constituée d'une unité isoprène (C₅H₈). Selon le nombre d'unités d'isoprène, les terpènes sont classés en :

- Monoterpènes (C₁₀)
- Les sesquiterpènes (C₁₅)
- Les diterpènes (C₂₀)
- Les triterpènes (C₃₀)
- Les tétraterpènes (C₄₀)
- Les polyterpènes (>C₄₀). [43]

Les terpénoïdes sont responsables de l'odeur typique de nombreuses plantes et ils interviennent dans la stabilisation des membranes cellulaires, régulateurs de la perméabilité et des réactions enzymatiques. Et ont démontré leur efficacité dans la chimioprévention et la chimiothérapie du cancer et expriment des activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antihyperglycémiques, anti-inflammatoires et antiparasitaires [44]. Ces molécules se présentent en forme des huiles essentielles, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol) [45].

I.8.2.1.3. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé [46]. Se trouvent dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. [47] L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel il est directement lié au moins à un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside. [48] Les composés phénoliques naturels regroupent plus de 8000 substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles [49].

Allant de molécules simples à des composés hautement complexes [50]. L'accumulation de ces dernières dans les plantes, varie quantitativement et qualitativement non seulement dans les différentes parties de la plante, mais aussi d'une espèce végétale à une autre. Il existe généralement 4 types :

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques),
- Les flavonoïdes qui représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée,
- Les tanins et lignines,
- Et plus rares, les coumarines et les stilbènes.

a. Acides phénoliques :

Le terme acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique [51]. Ces acides phénoliques sont largement répandus chez les plantes. Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique [52].

- Acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide Gallique.
- Acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide Férulique [53].

b. Les flavonoïdes :

Le nom flavonoïde est dérivé du mot « Flavus » en latin, qui signifie jaune. Ils ont été désignés sous le nom de vitamine P (1936), en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins. Le terme a ensuite été abandonné puisque les flavonoïdes ne rencontraient aucune des caractéristiques associées à la définition d'une vitamine [54]. Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires, ils sont largement distribués dans les tissus végétaux, où ils sont présents à l'intérieur des cellules ou à la surface de différents organes végétaux. Les flavonoïdes constituent des pigments qui sont souvent responsables de la coloration bleue, violette, jaune, orange et rouge de différents organes végétaux avec les caroténoïdes et la chlorophylle [55]. Ils sont synthétisés à partir de la phénylalanine dans le cadre de la voie plus large des phénylpropanoïdes [56]. Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes [48] (Figure I.4).

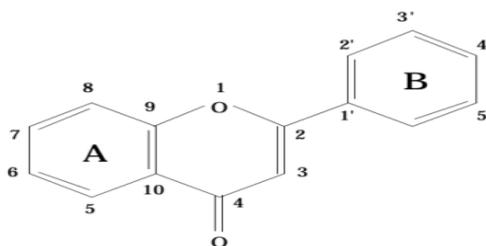


Figure I. 4 : Structure de base des flavonoïdes [54].

c. Les tanins :

Les tanins sont des polyphénols hydrosolubles de masse moléculaire compris entre 500 et 3000 Da, qui présentent à côté de réactions classiques des phénols la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [57]. Et on a également une aptitude à transformer les peaux fraîches en cuir imputrescibles [58]. Les tanins sont localisés dans les différents organes : tige, feuilles, fruits ou graines dans les vacuoles cytoplasmiques des cellules dites périphériques c'est-à-dire situées essentiellement au niveau des épidermes, et sont donc facilement libérés [57]. En général, ils sont divisés selon la structure chimique, le poids moléculaire, la solubilité dans l'eau en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [59].

➤ Tanins hydrolysables :

Sont des esters de sucre simple (glucose ou xylose principalement) et d'acides phénoliques. Après l'hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique, les acides phénoliques libérés sont l'acide gallique ou l'acide ellagique ce qui divise ces tanins hydrolysables (Figure I.6) en deux sous-classes :

-Les tanins galliques (gallotanins).

-Les tanins ellagiques (ellagitanins) [57] (Figure I.5).

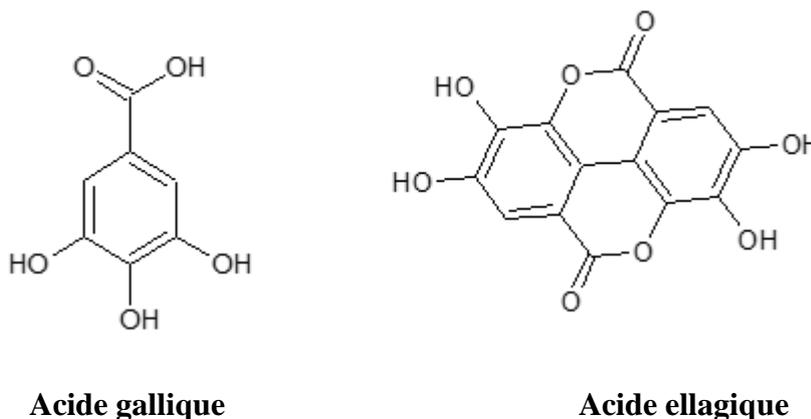


Figure I. 5 : Structure de l'acide gallique et l'acide ellagique [59].

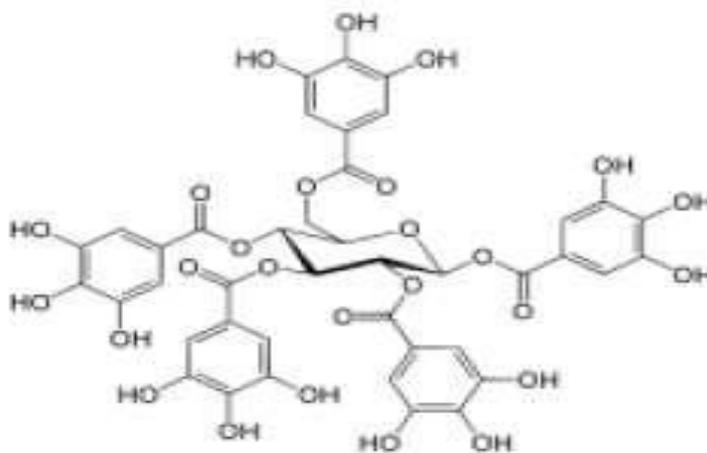


Figure I. 6 : Structure des tanins hydrolysables [60].

- Acide gallique :

L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) est un composé organique aromatique, l'un des six isomères de l'acide trihydroxybenzoïque, largement répandu dans les plantes soit sous forme libre soit comme composant des gallotannins [48]. Cet acide est classé dans les acides phénols (ou acides phénoliques) puisqu'il comporte à la fois une fonction carboxylique et des hydroxyles phénoliques. Et comme il est dérivé de l'acide benzoïque, on le classe aussi dans les acides hydroxybenzoïques. On le trouve à l'état naturel dans des galles de chênes (ou noix de galle), de sumac, d'hamamélis, les feuilles de thé, l'écorce de chêne, la peau de grenade, entre autres plantes. Sa formule chimique est $C_6H_2(OH)_3COOH$. Les sels et esters issus de cet acide sont appelés gallates. Fréquemment utilisé dans l'industrie pharmaceutique, il est un précurseur pour la synthèse de la mescaline.

-Acide ellagique :

L'acide ellagique résulte de la déshydratation et de l'oxydation de l'acide gallique aux dépens duquel il a été obtenu par Loewe et d'autres chimistes, soit par l'acide arsénique qui est réduit, soit par $POCl_3$, soit par l'action oxydante de l'iode [61].

➤ Tanins condensés :

Encore appelés tanins catéchiques, ont une constitution moins bien connue car ces produits sont très complexes. L'action des acides dilués, au lieu de conduire à des produits plus simples, donne au contraire des composés plus condensés [58]. Les tanins condensés sont les tanins les plus répandus dans les plantes vasculaires [59]. Ils sont des polyphénols de la famille des flavonoïdes, et sont beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables car non hydrolysables et peu absorbés par la muqueuse digestive en raison de leur poids moléculaire élevé [62] (Figure I.7).

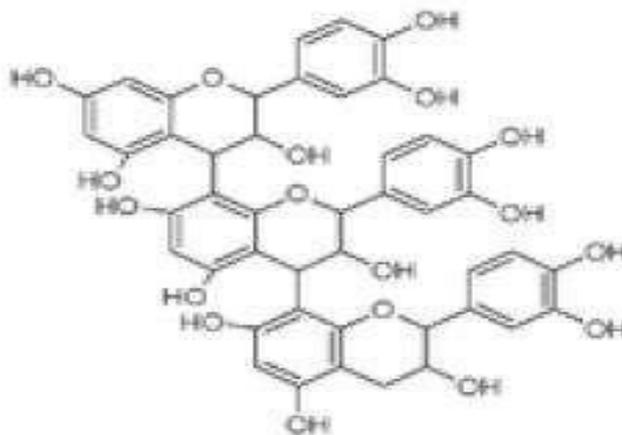


Figure I. 7 : Structure des tanins condensés [60].

d. Les coumarines

Les coumarines viennent du mot « coumarou » non vernaculaire de la fève de Tonka [63]. Isolées la première fois de *Coumarouna odorata* par Vogel en 1820, aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes [64]. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituant [65]. Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance des plantes. Certaines d'entre elles sont induites par des stress abiotiques et biotiques et possèdent une activité antimicrobienne telles les furanocoumarines de persil [66].

I.9. Les activités biologiques de la grenade :

I.9.1. L'activité antimicrobienne :

Punica granatum renferment des quantités substantielles de polyphénols tels que les tanins, l'acide ellagique et l'acide gallique. Ces composés phytochimiques possèdent plus d'une bio activité et plus d'une propriété antimicrobienne. Plusieurs expériences ont mis en évidence leurs activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes et multi résistantes [67].

➤ *Escherichia coli* :

Escherichia coli est une espèce de la famille des entérobactéries, qui fait partie de la microflore commensale de l'intestin de l'homme et des animaux. Elle est peu dangereuse sur le plan sanitaire, à moins qu'elle ne se propage dans une autre partie du corps comme l'abdomen, les voies urinaires inférieures ou le cerveau dans le cas des nouveau-nés. Les souches d'*E. coli* pathogène peuvent provoquer des crampes d'estomac, des vomissements, de la fièvre, des nausées, de la diarrhée, qui peuvent même être mortelle dans certains cas.

Escherichia coli uropathogène est la principale cause de plus de 80 % des infections non compliquées des voies urinaires. Asadishad et *al.*, (2012) ont rapporté que l'exposition de la souche uropathogène *Escherichia coli* CFT 073 à l'extrait d'écorce de grenade entraîne une diminution de l'expression du gène de la flagelline (*fliC*) et de la production de flagelline, ce qui a empêché la bactérie de se propager dans les voies urinaires supérieures. En testant l'activité inhibitrice de la poudre du fruit de grenade et de la punicalagine, Asadishad et *al.*, (2012) ont constaté que la poudre de grenade présentait l'activité inhibitrice la plus élevée sur la motilité de nage avec un pourcentage de 70 %. L'activité inhibitrice de l'extrait d'écorce et de la punicalagine était de 50 % et 14 %, respectivement. Ces résultats indiquent une action synergique entre les composés phytochimiques de la grenade de sorte qu'ils ont une activité antimicrobienne significativement plus élevée que la punicalagine, l'un des principaux composés bioactifs de la grenade [67] (Figure I.8).

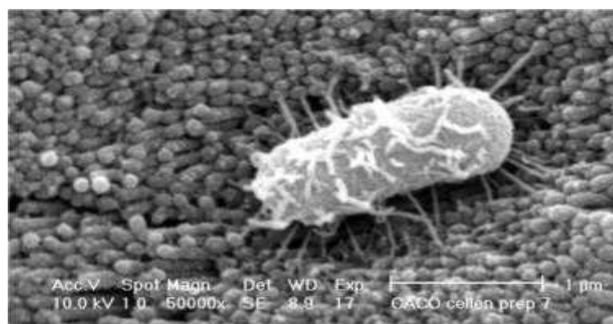


Figure I. 8 : Cellule unique de *Escherichia coli* adhérant à des cellules CACO-2 de 19 jours, observée au microscope électronique à balayage (SEM) [68].

➤ ***Staphylococcus aureus* :**

Staphylococcus aureus appartient à la microflore cutanée d'environ un tiers de la population et ne provoque pas de maladie chez ces individus. Cependant, selon la souche bactérienne et l'état du système immunitaire, la bactérie peut provoquer une inflammation de la peau et des os, infecter les tissus mous et même le sang. *Staphylococcus aureus* est la cause la plus fréquente d'infection des plaies chirurgicales hospitalières.

La résistance aux médicaments antimicrobiens chez les bactéries pathogènes est une préoccupation mondiale. *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène nosocomiaux provoquant fréquemment une multirésistance. *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM) est toute souche de *Staphylococcus aureus* qui a développé une résistance aux bêta-lactamines, y compris les pénicillines et les céphalosporines. Ces souches de SARM ne sont pas nécessairement plus virulentes que les souches de *S. aureus* sensibles aux antibiotiques, mais elles sont plus dangereuses car elles ne répondent pas aux antibiotiques de première ligne. Le SARM peut provoquer des infections potentiellement mortelles chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli, en particulier dans les pays sous-développés où les antibiotiques ne sont pas facilement disponibles.

Dans une étude, l'extrait éthanolique de grenade a inhibé 35 souches de SARM avec une CMI de 0,2-0,4 mg/ml. La microscopie électronique à balayage des bactéries a montré que l'extrait de grenade provoquait des altérations des parois cellulaires bactériennes après 2 heures de traitement (Howell et D'souza, 2013). D'autres chercheurs ont comparé l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et éthanolique du fruit de grenade, contre des souches de *Staphylococcus aureus*, à des antibiotiques commerciaux. Les résultats obtenus avec les deux extraits ont montré une activité très forte et comparable avec les antibiotiques testés. L'activité de l'extrait méthanolique était comparable à l'activité de la cloxacilline. L'activité de l'extrait éthanolique à 95% était similaire à celle de la clindamycine, le chloramphénicol, la vancomycine et la gentamycine [67].

I.9.2. Activité antioxydante :

Les grenades sont parmi les fruits les plus riches en composés phénoliques, la composition des différentes parties du grenadier a montré l'existence de plusieurs types de polyphénols ayant des propriétés antioxydantes très importantes à savoir les tannins que l'on trouve en concentration très élevée dans les tiges et l'écorce du grenadier.

L'activité antioxydante *in vitro* de la grenade et de ses produits dérivés a été évaluée par plusieurs auteurs, qui ont déterminé que la haute capacité antioxydante de la grenade et de ses produits dérivés est due à la présence des punicalagines dans sa composition [67]. Il existe autre activité de grenade tel que :

- Activité antifongique
- Activité antivirale
- Activité antidiabétique
- Activité anti-inflammatoire
- Activité anticancéreuse

- Activité anti-ulcérogène
- Activité cicatrisante
- Effet sur les maladies cardiovasculaires

I. 10. Les principales méthodes d'extraction :

Il existe de nombreuses méthodes d'extraction qui ont évolué au fil du temps avec les avancées technologiques on mentionne :

- La macération
- L'expression à froid
- L'extraction par solvants
- L'enfleurage
- L'hydro distillation
- L'extraction au dioxyde de carbone (CO₂) et au CO₂ supercritique
- La turbo distillation et la distillation à la vapeur [69].

Chapitre II : La microencapsulation et la cinétique de libération de principe actif

II.1. Généralités sur les médicaments :

II.1.1. Définition :

Selon l'OMS : « on entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives à l'égard des maladies humaines ou animales ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier des fonctions organiques, ils proviennent des végétaux, d'animaux, de microorganismes ou de la chimie fine (synthèse) » [70].

II.1.2. Formes galéniques

La forme galénique d'un médicament, désigne la forme individuelle sous laquelle sont mis les principes actifs et les excipients (matières inertes). Elle correspond à l'aspect physique final du médicament tel qu'il sera utilisé chez un patient : comprimés, gélules, sachets, solutions buvables, suspensions injectables, etc. Les formes galéniques les plus courantes sont résumées dans le Tableau II.4 [71].

Tableau II. 1 : Formes galéniques des médicaments [71].

Voies	Formes principales
Orale	Comprimés, gélules, solutions ou suspensions aqueuses
Parentéral	Solutions aqueuses
Rectale	Suppositoires
Vaginale	Comprimés, solutions aqueuses
Ophthalmique	Solutions aqueuses
ORL	Solutions aqueuses pulvérisées ou non
Percutanée	Pommades et solutions

II.1.2.1. Pommade :

II.1.2.1. 1.Définition :

Les pommades sont des préparations de consistance molle, obtenues par le mélange d'une substance médicamenteuse avec un excipient approprié ; elles sont appliquées sur la peau soit dans le but d'administrer des médicaments par voie dermique, ou pour obtenir une action locale superficielle. Les pommades qui contiennent des résines sont appelées des onguent et celles renfermant une forte proportion de poudres sont des pates dermique .Les baumes sont des pommades douées d'une propriété antalgique et anti-inflammatoire les crèmes sont des préparation de consistances liquide résultant de

la dispersion d'un liquide sous forme de fines gouttelettes (huile) au sein d'un autre liquide non miscible (eau). Ces sont des émulsion les gels sont des préparations de consistances solides constitués à l'aide d'agents gélifiants [72].

II.1.2.1.2. Intérêts thérapeutiques des pommades :

Les pommades en plus de leurs action émoullientes et protectrices sur la peau, règlent le potentiel d'hydrogène (PH) cutané à la normale. Elles ont une action générale par voie cutanée sans passer par le foie. En plus de leur application dermique, elles peuvent être appliquées sur les muqueuses rectales, vaginales, conjonctivales [73].

II.1.3. Définition d'un principe actif :

Il s'agit de la substance présente dans le médicament qui lui confère ses propriétés thérapeutiques ou préventives [74].

II.1.4. Excipients :

On appelle excipient, toutes substances sans activité thérapeutiques spéciale permettant l'incorporation des médicaments. Les excipients pour pommades peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Selon la nature de l'excipient, la préparation peut avoir des propriétés hydrophiles ou hydrophobes. Elle peut contenir des additifs appropriés tels que les antimicrobiens. Les agents stabilisants, les émulsifiants, les épaississants. D'où leur classification suivante non exhaustive [75].

II.2. Généralités sur l'encapsulation :

II.2.1. Définition de l'encapsulation :

L'encapsulation est une technique qui consiste à piéger ou enrober une substance ou un mélange de substances spécifiques à l'aide de matériaux adaptés. Les substances à encapsuler peuvent être liquides, solides ou gazeuses. Ce sont souvent des principes actifs sensibles ou instables à certains facteurs environnementaux ayant une action ciblée (vectorisation), ou bien des substances dont on souhaite modifier l'état (transformation d'un liquide en solide par exemple) [76].

Dans le domaine d'encapsulation 2 types de particules peuvent être obtenues selon leurs tailles :

- Microparticules
- Nanoparticules

D'après Benoit et al., (2013) ; la taille des microparticules est comprise entre 1µm et 1000µm, Thies, (1987) a réduit l'intervalle de définition des microparticules de 1µm à 500µm.

D'après ces intervalles, toutes les particules qui représente un diamètre inférieur à 1 μ m sont considérées comme des nanoparticules.

II.2.2. Intérêt de l'encapsulation

Suivant les domaines et les applications, l'encapsulation a pour but d'assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation. Elle permet d'améliorer la présentation d'un produit ou encore de masquer une odeur ou un goût. Enfin, l'encapsulation peut modifier et contrôler le profil de libération d'une substance active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché [77].

L'encapsulation a un bénéfice pour la modification des caractéristiques physiques du produit original afin de [78] :

- Faciliter la manipulation
- Aider à séparer les composants du mélange qui réagirait autrement entre eux.
- Fournir une concentration adéquate et une dispersion uniforme d'un agent actif.

D'une manière générale, l'encapsulation peut être considéré comme un moyen qui permet le piégeage d'un ou plusieurs objets au sein d'un matériau en vue de [79].

- Son immobilisation
- Sa protection
- Le contrôle de sa libération
- Sa structuration et Sa fonctionnalisation.

II.2.3. Les différents procédés d'encapsulation :

Les différentes méthodes de microencapsulation peuvent être classifiées selon différents critères. Richard et Benoit (2000) proposent quatre manières différentes de classer les méthodes d'encapsulation :

- ✓ Les procédés peuvent être classés selon l'emploi ou non de solvant organique, certaines techniques telles que la coacervation complexe utilisant des fluides supercritiques.
- ✓ La nature du milieu dispersant peut également servir de base à une classification : il peut être liquide (polycondensation interfaciale, coacervation, ...), gazeux (spray drying, enrobage en lit fluidisé, ...), ou encore à l'état supercritique (séparation de phase, ...).
- ✓ La famille à laquelle appartient le composé employé pour obtenir la capsule peut également permettre de classer les modes d'encapsulation : peuvent être utilisés des

polymères préformés (coacervation, ...), des lipides (spray congealing, ...), ou encore des monomères (polycondensation interfaciale, polymérisation en milieu dispersé, ...).

- ✓ Enfin, une dernière classification repose sur la nature du principe selon lequel est réalisée la microencapsulations : on distingue les procédés physico-chimiques des procédés chimiques et mécaniques.

Les différentes méthodes d'encapsulation sont récapitulées dans le tableau présenté ci-dessous selon la dernière classification présentée précédemment [80].

Tableau II.2 : Classification des techniques d'encapsulation selon la nature du procédé [80].

Type de procédé	Mode d'encapsulation	Gamme de tailles de microcapsules obtenues	Types de produits obtenus
Procédés physicochimiques	Séparation de phases où Coacervation (simple ou Complexe)	2 – 1200 µm	Microcapsules Microsphères
	Evaporation – extraction de solvant	0,5 – 200 µm	Microsphères
	Gélification thermique D'émulsions (hot melt)		Microsphères
Procédés Chimiques	Polycondensation Interfaciale	2 – 2000 µm	Microcapsules
	Polymérisation interfaciale Polymérisation en milieu, Disperse par voir radicalaire Ou anionique	2 – 2000 µm	Microcapsules Microsphères
Procédés Mécaniques	Nébulisation/séchage (spray Drying)	1 – 200 µm	Microsphères
	Gélification ou congélation De gouttes (priling)	200 – 800 µm	Microsphères
	Enrobage en lit fluidise (Spray-coating)	35 – 5000 µm	Microcapsules
	Extrusion/sphéronisation	≥ 200 µm	Microsphères

II.2.4. Type des microparticules

➤ Les systèmes matriciels (microsphères)

Les microcapsules sont des structures réservoirs et sphériques, elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques

nanomètres, le taux d'encapsulation peuvent être particulièrement élevées : entre 85% et 90% de masse de matière active par rapport à la masse de microparticules [81].

➤ **Les systèmes réservoirs (microcapsules)**

Les microsphères sont des structures matricielles, de forme sphérique, constituées de polymères de référence (bio) dégradable. Dans le cas de microsphères, le principe actif est soit incorporé à l'intérieur d'un réseau polymères durant la formation des microsphères. Dans ce cas, les teneurs en matière active sont moindres : de l'ordre de 20% à 35% mais parfois ce taux atteindre 50% [81] (Figure II.1).

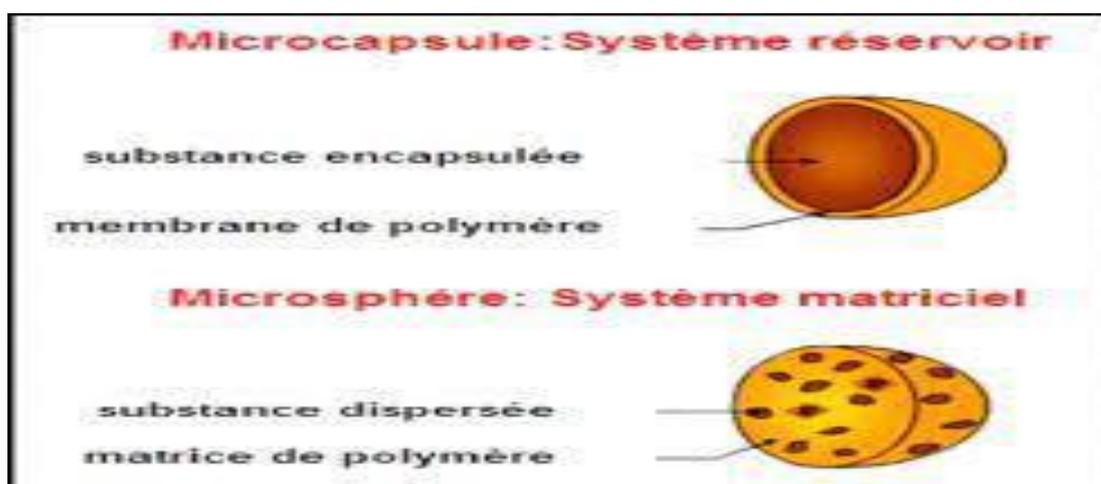


Figure II.1 : Différent système de microparticules [81].

II.3. Généralités sur la pharmacocinétique :

II.3.1. Définition :

La pharmacocinétique est l'étude en fonction de temps (cinétique) des différents processus (Absorption, distribution, métabolisme et excrétion, ou ADME) gouvernant le devenir d'un médicament dans l'organisme. En d'autres termes, la pharmacocinétique représente l'effet de l'organisme sur le médicament [82].

II.3.2. Les modèles cinétiques de libération des PAs :

La phase d'absorption des PAs est intimement liée à la phase de libération de sa Formulation galénique et de dissolution dans le milieu biologique correspondant au site d'administration. Ainsi la phase de libération et celle de dissolution sont les facteurs limitants la phase d'absorption. Ces facteurs limitants sont les outils de la conception des formes à Libération modifiée. La vitesse de libération du PA de la forme galénique peut être accélérée, Retardée, ciblée par rapport à la libération immédiate grâce à des formulations, des excipients Ou des processus de fabrication différents [83].

II.3.2.1. Libération prolongée :

La libération prolongée d'un principe actif est celle pour laquelle la dose unitaire totale est retenue au sein d'un système contrôlant la vitesse de libération. La rétention du principe actif peut être faite par son inclusion dans un excipient insoluble dans les liquides de l'organisme qui forme aussi une espèce de matrice à partir de laquelle le principe actif sera libéré lentement. La libération prolongée est basée sur deux principes :

- La vitesse de libération du principe actif à partir de la forme galénique est plus lente que dans le cas de libération conventionnelle. Cette étape est préalable aux étapes de dissolution et d'absorption. Elle correspond donc au facteur limitant qui contrôle la dissolution et l'absorption.
- La durée de cette libération augmente avec le temps.

Ces formes sont essentiellement représentées par les matrices [84] (Figure II.2).

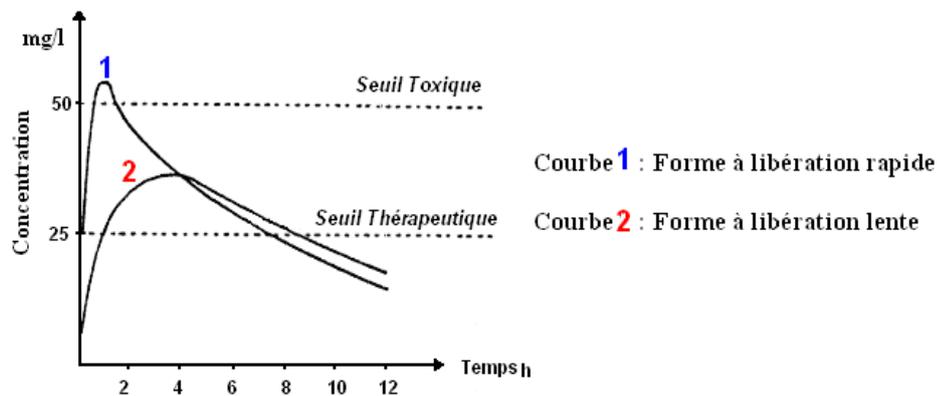


Figure II.2 : Présentation des profils de libération prolongé et immédiate [84].

II.3.2.2. La libération répétée :

En prenant une seule dose, on observe une courbe similaire à celle obtenue avec des doses répétées d'un médicament conventionnel. Ces formes à libération libérées libèrent une dose initiale, suivies après un certain laps de temps par une ou plusieurs doses équivalentes de principes actifs. Le problème principal est l'obtention d'un intervalle de temps convenable entre les différentes libérations [83].

II.3.2.3. La libération retardée :

La libération du PA peut être retardée dans le temps ou l'espace par rapport à la libération immédiate. Ces formulations sont appelées « formes retard ». Le profil plasmatique conventionnel est déplacé vers la droite [83].

II.3.2.4. La libération séquentielle :

La libération du PA peut être séquentielle ou répétée. Le profil plasmatique présente plusieurs courbes de concentration plasmatique conventionnelle qui se superposent le plus souvent pour obtenir un effet prolongé. Les systèmes à libération séquentielle ou systèmes complexes comprennent les comprimés multicouches et les comprimés matriciels et réservoirs. Les comprimés multicouches sont des comprimés comprenant plusieurs phases de désagrégation ou dissolution du PA. Le système complexe matriciel ou réservoir représente un comprimé contenant des minigranules enrobées par exemple [83] (Figure II.3).

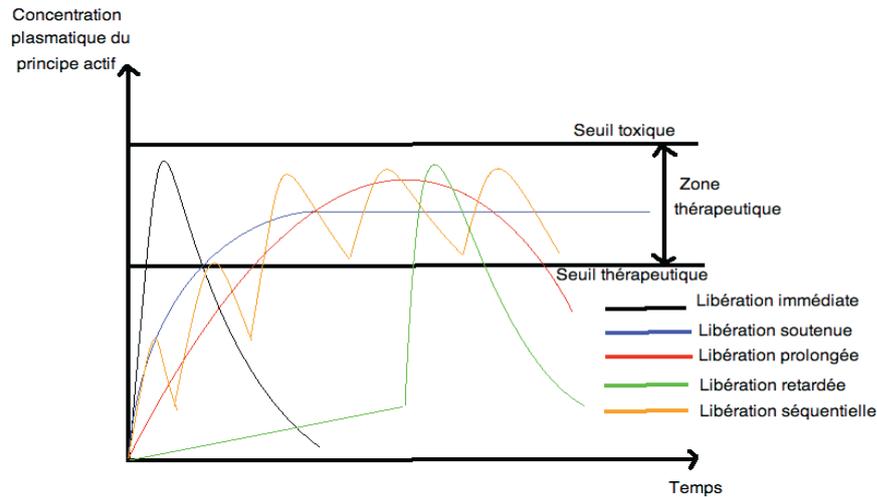


Figure II.3 : Les différents profils de libération des PA [83].

II.4. Les techniques d'analyse :

II.4.1. Principe de la HPLC :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [86].

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par le schéma suivant :

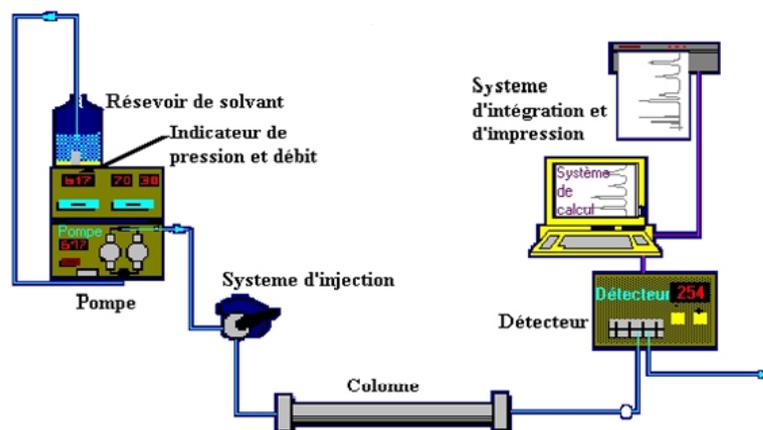


Figure II.4 : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC [86].

II.4.2. Appareillage :

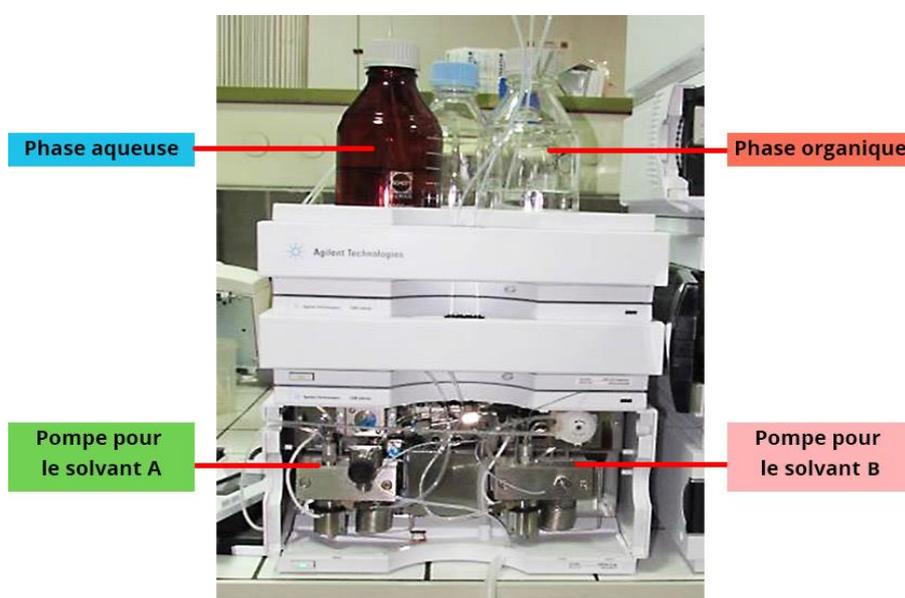


Figure II. 5 : HPLC [87].

II.4.2. L'infrarouge :

L'infrarouge est une méthode très utilisée pour la caractérisation et l'identification des composés ou de leurs groupements fonctionnels (liaisons chimiques) dans un mélange d'extraits. L'identification des liaisons se fait par absorption d'une énergie à un nombre d'onde correspondant à la liaison caractéristique donné par l'IR un spectre d'un composé inconnu et sera identifié par comparaison à la bibliothèque des données IR [88].

II.4.3. La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible :

C'est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200 nm – 400 nm), du visible (400 nm – 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm -1 400 nm). Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions

électroniques. Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide. Le spectre électronique est la fonction qui relie l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde [89].

II.5. Les plans d'expériences :

II.5.1. Définition :

Un plan d'expérience constitue une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manières efficaces et économique. La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats [90].

II.5.2. Les types de plan d'expérience :

II.5.2.1. Plans factoriels complets :

La réalisation d'un plan d'expérience peut être très simple ou très compliquée suivant le nombre de facteur à étudier et les hypothèses à formuler. L'étude d'un plan complet consiste à étudier toutes les combinaisons possibles des facteurs pris dans l'expérience. On note ce plan X_k ce qui signifie que cette expérimentation concerne un système comportant k facteurs à X niveaux. Le nombre d'expériences nécessaires pour l'ensemble des combinaisons est facile à calculer pour deux facteurs ($2^k=2^2=4$). Le plan utilise quatre expériences. Dans le cas d'un plan comportant plusieurs niveaux différents (exemple pour trois facteurs à deux niveaux et de facteurs à quatre niveaux le plan complet comporte $2^2 \times 4^2 = 128$ expériences [91].

II.5.2.2. Plan composite centré :

Les plans composites centrés peuvent ajuster un modèle quadratique complet. Ils sont souvent utilisés lorsque le plan demande une expérimentation séquentielle, car ces plans peuvent intégrer des informations provenant d'une expérience factorielle correctement planifiée. Le plan composite centré est le plan de surface de réponse le plus utilisé. Les plans composites centrés comprennent un plan factoriel ou un plan factoriel fractionnaire avec des points centraux, auxquels s'ajoute un groupe de points axiaux (ou étoiles) qui permettent d'estimer la courbure [92].

II.5.2.3. Plans de Box-Behnken :

Box et Behnken (1960) ont introduit un type différent de plans d'expériences pour les modèles du deuxième ordre qui permettent l'estimation de certaines interactions. Comme les plans de Box-Behnken comportent moins de points, leur coût est moindre que celui des plans composites centrés pour le même nombre de facteurs. Un plan de Box-Behnken est un type de plan de surface de réponse qui ne contient pas un plan factoriel fractionnaire ou un plan factoriel fractionnaire. Les plans

de Box-Behnken pour 3 facteurs impliquent trois blocs, dans chacun, un plan factoriel est représenté par chaque paire de traitement pendant que le troisième facteur reste fixé à 0. Donc le plan de Box-Behnken de 3 facteurs possède 15 essais (12 arêtes et 3 Points au centre-Figure) [93] (Figure II.6).

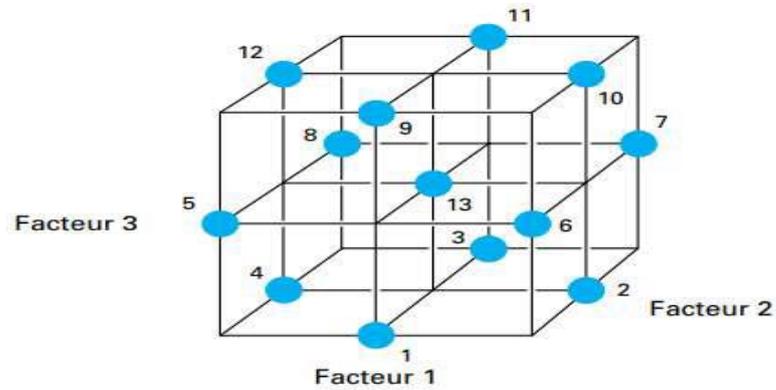


Figure II.6: Plan de Box-Behnken pour trois facteurs [93].

Partie pratique

- **Chapitre III : Matériels et méthodes**
- **Chapitre IV : Résultats et discussion**

Chapitre III : Matériel et méthode

III.1. Les échantillons :

Les grenades utilisées dans ce travail sont de variété WONDERFUL qui est d'origine de États-Unis exactement en Floride, elle est de peau épaisse et coriace de couleur rouge profond presque grenat, gout sucré et acide de taille assez importante par rapport aux autres variétés avec une pulpe juteuse, le choix de cette variété est basé sur sa composition phytochimique (Acide gallique et Acide ellagique, tanins galliques), qui se trouve en grande quantité typiquement dans l'écorce de cette variété de grenade "WONDERFUL". Les échantillons ont été achetés après une sélection très précise des fruits de même taille et couleur au centre commercial Ritaj Mall en face de la résidence Universitaire pépinière province de Bejaia pendant la période de récolte de cette variété plus précisément en mois de Novembre.

III.1.1. Préparation des échantillons :

Après le nettoyage et le rinçage de ces fruits, leurs écorces sont placées dans un porte-mangé propre et sec, dans un endroit frais à l'abri de la lumière solaire et de la chaleur, afin de les faire sécher correctement sans risque de pourriture des écorces et la dégradation de leurs composés chimiques et phytochimiques. La durée de séchage des écorces de *Punica Granatum* est de 4 mois (de Novembre jusqu'à la fin de février) le poids des écorces dans cette étape est de **90 g**, **88 g** de ces dernières ont été placées dans une étuve à température de **60°C** pendant 2 heures pour ainsi obtenir des écorces assez sèches. Le total de la masse des écorces de *Punica Granatum* obtenues post-séchage s'élève à **87 g (Figure III.1)**.



Figure III.1 : Ecorce sèche de *punica granatum*.

Après le séchage des écorces, vient ensuite le broyage de ces dernières par deux méthodes : le broyeur à couteaux constituée d'une chambre au-dessus d'un tamis de 100 μm et d'un plateau de récupération et un mortier en porcelaine (**Figure III.2**). La poudre obtenue a été soumise à un

processus de tamisage à l'aide d'un tamis de maille de 100 micromètres pour arriver à la texture envisagée, à la suite de cette opération une quantité de **41.0113 g** de poudre a été récupérée à partir des écorces (**Figure III.2**).

NB : Le broyeur s'est révélé inefficace pour cette Variété car elle a une teneur en huiles supérieure à celle des autres variétés, ce qui a entraîné la combustion des écorces. Par conséquent, l'opération de broyage a été poursuivie à l'aide d'un mortier.



Figure III.2: Broyeur et un mortier en porcelaine utilisé pour le broyage.



Figure III.3 : La poudre avant et après tamisage dans le tamisier et dans une balance analytique de précision.

III.2. Extraction des composés phénoliques et flavonoïdes de l'écorce de Grenade :

Ces composés ont été extraits par deux méthodes : Macération dans le méthanol aqueux et extraction liquide-liquide dans deux différents solvants éther de pétrole et dichlorométhane.

III.2.1. Extraction par macération dans le méthanol aqueux (extraction solide/liquide) :

40 grammes de poudre d'écorce de grenade ont été dispersés dans un mélange de méthanol et d'eau distillée, avec des volumes respectifs de 160 ml et 40 ml, dans un erlenmeyer de 500 ml sous agitation énergique et continue pendant 24 heures à température ambiante. Ce dernier a été recouvert d'un papier aluminium et fermé hermétiquement avec du Parafilm sur le dessus pour éviter toute infiltration de lumière (**Figure III.4**). La solution obtenue (EBEG) a été filtrée dans un autre erlenmeyer de 500 ml à l'aide de papier filtre (**Figure III.5**), puis recouverte de papier aluminium et fermée avec du Parafilm pour une conservation optimale.



Figure III.4 : Procédure de macération.



Figure III.5 : EBEG avant et après filtration.

➤ Rendement de l'extraction par macération :

Un échantillon de 10 ml du filtrat a été prélevé et placé dans une boîte de Petri préalablement pesée, puis laissé à température ambiante pendant 3 jours avant d'être placé dans une étuve à 60°C pendant 1 heure afin de permettre l'évaporation totale des solvants. Ensuite, la boîte de Petri a été pesée à nouveau, et la masse du résidu sec de la macération a été déterminée en utilisant la relation suivante :

$$M (\text{résidu sec}) = P_f - P_0$$

- P_f : poids final après séchage (tare + résidu sec)
- P_0 : poids initial de la boîte à pétri vide.
- La masse de l'extrait M (extrait sec) pour le volume total V de la solution de macération est calculé par cette relation : $M (\text{extrait sec}) = M (\text{résidu sec}). (V / 10)$

Ainsi, le rendement de l'extraction peut être calculé en utilisant cette formule :

$$R \% = \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{éch}}} \times 100$$

III.2.2. Extraction par solvant (Extraction liquide / liquide) :

Trois solvants de polarité croissant ont été choisis pour ce type d'extraction sur des critères spécifiques (solubilité de l'extrait dans le solvant, densité, miscibilité et l'état physicochimique du solvant) pour garantir une bonne extraction se sont l'éther de pétrole, le dichlorométhane.

a. Extraction par l'éther de pétrole (EEP) :

50 ml du filtrat sont introduits dans une ampoule à décanter, avec de 50 ml d'éther de pétrole (EP). Après agitation le mélange est laissé en décantation pour une durée de 20 minutes jusqu'à ce que le mélange se sépare en deux phases :

- Une phase supérieure organique de couleur transparente (EEPEG).
- Une phase inférieure aqueuse de couleur rouge foncé.

La phase aqueuse, de couleur rouge foncé est soigneusement transférée dans un Erlen de 250 ml pour autre extraction. Et pour la phase organique, elle est délicatement transférée dans un Erlen de 250 ml et conservée de façon hermétique.

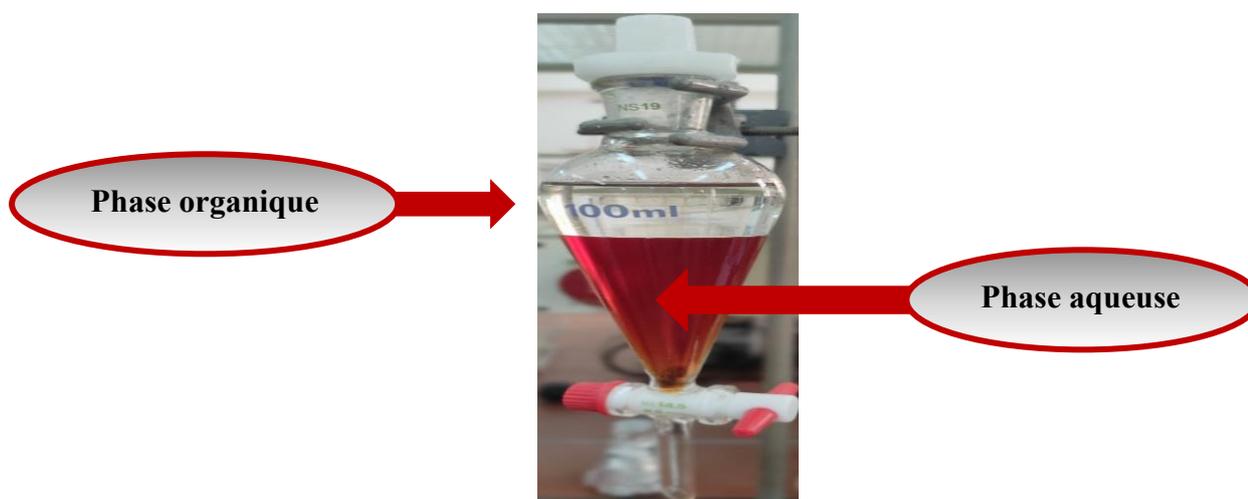


Figure III. 6 : Extraction par l'éther de pétrole.

b. Extraction par Dichlorométhane :

50 ml de la phase aqueuse récupérée lors de la première extraction sont ajoutés avec 50 ml de dichlorométhane ont été mélangés avec agitation dans une ampoule à décanter, le mélange est laissé en repos pour 20 minutes après l'évacuation des gaz jusqu'à l'apparition des deux phases (Figure III.7) :

- Une phase inférieure organique qui est Dichlorométhane (EGDCM) de couleur orange clair.
- Une phase supérieure aqueuse ou hydroalcoolique (EEGA) de couleur rouge foncé.

La phase organique est récupérée dans un Erlenmeyer de 250 ml, qui est ensuite recouvert d'aluminium et bien fermé avec du Parafilm pour une conservation optimale.

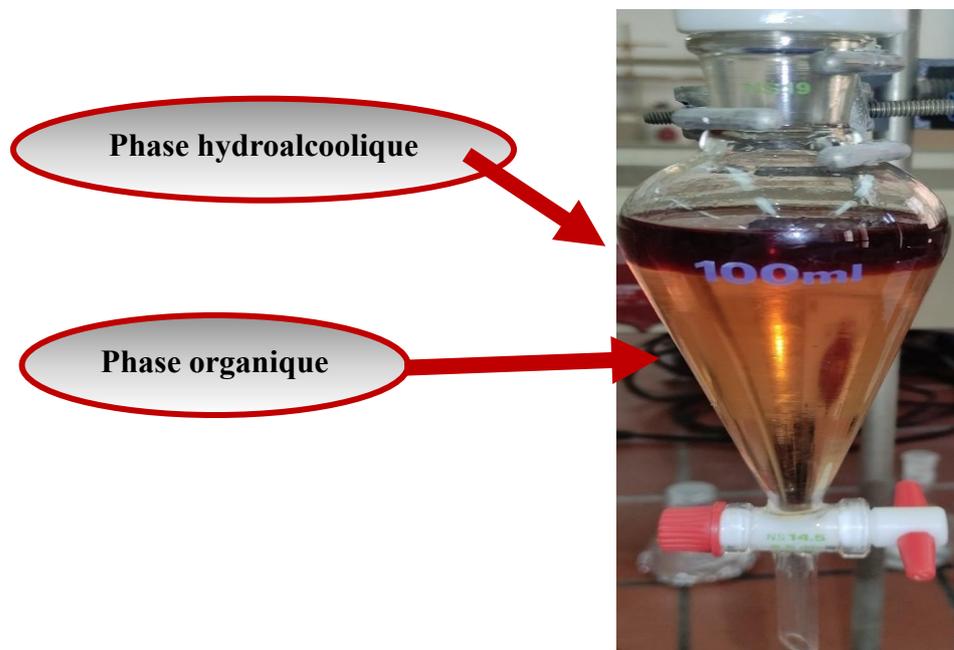


Figure III.7: Extraction par Dichlorométhane.



Figure III.8: Résultat de l'extraction liquide-liquide.

III.2.3. Analyse quantitative par spectroscopie UV-visible :

a. Dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 (Singleton et Rossi). Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses [94].

- **Mode opératoire :**

- **Préparation des solutions :**

- Solution mère d'acide gallique d'une concentration de 2mg /ml par la dissolution du 20mg d'AG dans 10ml d'eau distillée.
- Solution de Folin-Ciocalteu par mélange d'un volume de 1 ml de ce dernier dans 9ml d'eau distillée.
- Solution de carbonate de sodium d'une concentration de 0.075 mg/ml par la dissolution du 18.75g de Na₂CO₃ dans 250ml d'eau distillée.

- **Préparation des étalons de l'Acide Gallique :**

Nous réalisons les mélanges en ajoutant 2 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 1,6 ml de solution de Na₂CO₃ à 0,4 ml de chaque solution étalon (de E1 à E7), après une légère agitation de chaque tube pour homogénéiser les solutions, nous les laissons reposer pendant 2 heures afin d'incuber et développer la coloration bleue du complexe. Ultérieurement, nous mesurons les absorbances des solutions à une longueur d'onde de 765 nm par rapport à un blanc qui est constitué de 0,4 ml d'eau distillée mélangé avec 2 ml de Folin-Ciocalteu et 1,6 ml de carbonate de sodium, préparé dans les mêmes conditions que les étalons. Le tableau suivant montre la série des étalons effectuée par dilutions de la solution mère d'AG de concentration 2mg /ml.

Tableau III.1 : Les dilutions de la solution mère d'AG.

Etalons	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Solution de mère d'AG (ml)	0.1	0.2	0.3	0.5	0.6	0.7
Eau distillée (ml)	9.9	9.8	9.7	9.5	9.4	9.3
Ce (mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.1	0.12	0.14
Ve (ml)	0.4					
Folin(ml)	2					
Na₂CO₃	1.6					
ABS (765)	0.2205	0.3416	0.5470	0.8743	1.0339	1.3049

- **Dosage de l'extrait :**

Le dosage a été réalisé en ajoutant 2 ml de réactif de Folin et 1,6 ml de Na₂CO₃ aux solutions d'extrait préalablement diluées afin que l'appareil UV puisse mesurer l'absorbance. Chaque extrait a été dilué selon son facteur de dilution respectif, comme suit :

- **EEPEG** : diluée 100 fois (0,4 ml d'extrait avec 3,6 ml d'eau distillée). Ensuite, 0,4 ml de cette solution diluée est dosée avec 2 ml de réactif de Folin et 1,6 ml de Na₂CO₃.

- **EGDCM** : diluée 1000 fois (0,4 ml d'extrait mélangé à 3,6 ml d'eau distillée, puis elle est diluée une deuxième fois en ajoutant 0,4 ml de solution diluée à 3,6 ml d'eau distillée). Ensuite, 0,4 ml de cette dernière solution est dosée avec 2 ml de réactif de Folin et 1,6 ml de Na_2CO_3 .
- **EEGA** : diluée 2000 fois (0,4 ml d'extrait mélangé à 3,6 ml d'eau distillée, puis elle est diluée une deuxième fois en ajoutant 0,4 ml de solution diluée à 3,6 ml d'eau distillée). Ensuite, 0,4 ml de cette dernière solution est dosée avec 2 ml de réactif de Folin et 1,6 ml de Na_2CO_3 . Enfin, 2 ml de cette dernière solution sont pris et mélangés avec 2 ml d'eau distillée.
- **EBEG** : diluée 2000 fois c'est la même procédure telle que l'extrait EEGA.

Le lecteur de l'absorbance a été réalisée au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 765 nm contre le blanc.

b. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été effectué en utilisant la quercétine ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), un composé organique de teinte jaune, ainsi que le trichlorure d'aluminium (AlCl_3), un sel de couleur blanche. Le mélange de ces deux réactifs forme un complexe jaune, absorbant à une longueur d'onde de 430 nm.

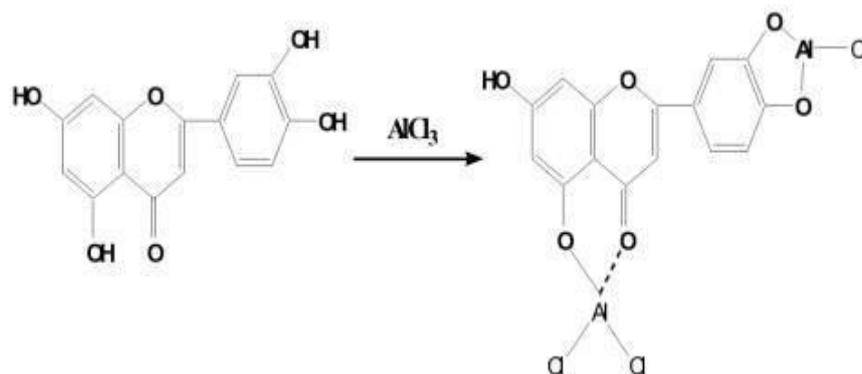


Figure III.9 : Schéma de réaction des flavonoïdes avec chlorure d'aluminium [95].

- **Mode opératoire :**

- **Préparation des deux solutions :**

- **Solution de trichlorure d'aluminium AlCl_3 à 2%** : 2g de sel AlCl_3 sont dissous dans 100 ml de MeOH
- **Solution mère de quercétine** : On dissout une prise d'essai de 15mg de quercétine dans 7.5 ml de MeOH.

- **Préparation des étalons de Quercétine :**

Le tableau ci-dessous présente la série d'étalonnage de concentration 2mg/ml réalisée en diluant la solution mère de quercétine.

Tableau III.2 : Les dilutions de la solution mère de quercétine.

Étalons	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Solution de mère Qr (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1
MeOH (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9
Ce (mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2
Ve(ml)	0.4					
AlCl3(ml)	2					
Ce'(ug/ml)	3.33	6.66	9.99	13.32	16.65	33.3
ABS (430nm)	0.2986	0.4585	0.6519	0.8672	0.9858	1.5630

On mélange 0.4 ml de chacun des étalons (de E1 à E7), avec 2 ml de solution de AlCl₃, on applique une légère agitation de chaque tube pour bien mélanger après on laisse en repos pendant 15 minute afin d'incuber et développer la coloration jaune du complexe. Après cela, on mesure les absorbances des étalons au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 430 nm par rapport au blanc contenant 0.4 ml de Méthanol mélangé avec 2 ml d'AlCl₃.

➤ **Préparation de l'échantillon de l'extrait :**

0,4 ml de chaque extrait ont été mélangés avec 2 ml de solution AlCl₃ dans des tubes à essai, Après une légère agitation, ils ont été laissés en incubation pendant 15 minutes. Ensuite, ils ont été passés au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 430 nm pour mesurer leur absorbance par rapport au blanc préalablement préparé (0,4 ml de méthanol mélangé avec 2 ml d'AlCl₃).

III.3. Activité antioxydante par méthode de DPPH :

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH^{*} donne lieu à une coloration violette foncée (**Figure III.5**) de la solution. La réduction des radicaux DPPH^{*} par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution en jaune [96].

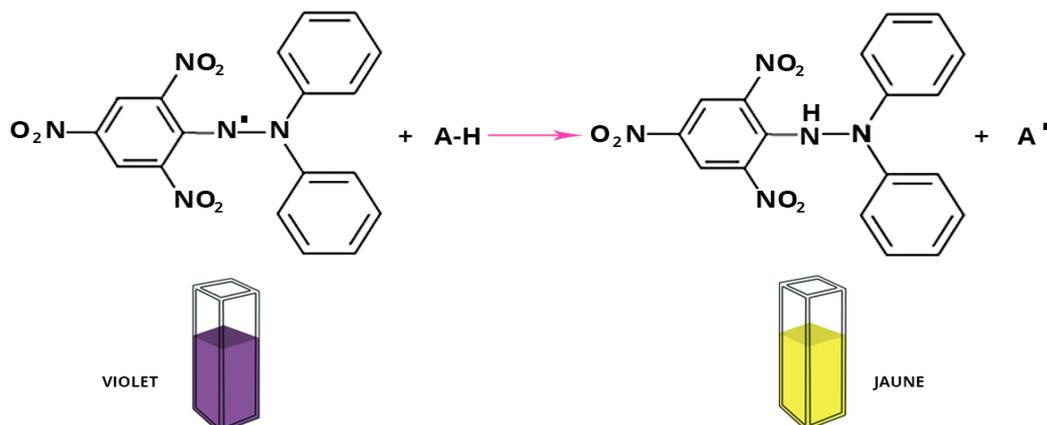


Figure III.10 : Représente la réaction chimique entre le radical DPPH violet et l'antioxydant jaune [97].

- **Mode opératoire**

- **Préparation de la solution DPPH de concentration 0.036mg/ml :** Dissolution 2 mg de DPPH pur avec le MeOH dans une fiole de 50ml, on complète au trait de jauge avec le MeOH.
- **Préparation des solutions diluées des EEG :** On réalise deux dilutions de chaque extrait concentré (EGDCM, EEPEG, EEGA, EBEG) dans le MeOH.

1^{ère} dilution : 0.1 ml de chaque extrait +1 ml de MeOH

2^{ème} dilution : 0.8 ml de chaque extrait + 1 ml de MeOH

Ensuite, on mélange 1 ml de chaque solution diluée avec 2 ml de solution de DPPH déjà préparée dans différents tubes d'essai, puis on laisse reposer pendant 30 minutes pour permettre à la réaction chimique de se compléter à l'abri de la lumière et à température ambiante. Nous incluons également un blanc constitué d'un mélange de 1 ml de MeOH et de 2 ml de solution de DPPH, préparé dans les mêmes conditions, afin de comparer le pouvoir d'inhibition antioxydant des extraites. Après, on procède à la lecture des absorbances de ces solutions par spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 517 nm.

- ✓ L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH, et calculée à partir de cette équation :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Abs Témoin} - \text{Abs échantillon})}{(\text{Abs Témoin})} \times 100$$

Inhibition% : pourcentage d'inhibition des radicaux libres.

Abs Témoin : absorbance du témoin.

Echantillon : Absorbance de la solution contenant l'échantillon.

III.4. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC :

Cette technique est utilisée pour séparer, quantifier et définir les composants d'un mélange. La technique HPLC est également utilisée pour révéler l'identité d'un médicament et pour suivre l'évolution du traitement sur une maladie [98]. La caractérisation est effectuée par une technique HPLC (UHPLC+ focused, Ultimat 3000 auto sampler column compartiment).

a. Protocole expérimental

➤ Préparation de la phase mobile, des solutions standards et des extraits

- La phase mobile est composée de trois solvants polaires : l'eau distillée, méthanol et l'acide acétique (470ml, 500ml, 25ml) respectivement.
- Acide gallique (2mg/ml) : Un volume 0.2ml d'AG est mélangé à un volume 1.8ml de la solution phase mobile.
- Quercétine (2mg/ml) : Un volume 0.2ml de quercétine est mélangé à 1.8ml de la solution phase mobile.
- 0.2ml de chaque extrait (20F, EBEG, EEGA, EGDCM,) est ajouté à 1.8ml de la phase mobile.

➤ Préparation des vials

0.1 ml de chaque extrait + 9.5ml de la phase mobile ont été injectés dans une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm. Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique pour un temps d'analyse de 20 min. Le débit est de 1 ml / min [99]. La détection a été effectuée par un détecteur UV à une longueur d'onde égale 250nm. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Débit : 1 ml/min.
- Pression de travail : 100-150 bars.
- Volume d'injection : 20µl.
- Longueur d'onde : 250 nm.
- Temps d'analyse : 20 min.
- Colonne C18

III.5. Micro encapsulations :

III.5.1. Les matières utilisées

a. Les polymères :

- **Le polyéthylène glycol (PEG)** : Glycol ou encore éthane-1,2-diol est le plus simple composé chimique de la famille des glycols (c'est le plus simple des diols). Liquide incolore, visqueux, hygroscopique, inodore, formule brute $C_2H_6O_2$ formule semi-développée $HO-CH_2-CH_2-OH$ [100].
- **Dextrine** : Famille de glucides amorphes, de formule brute $(C_6H_{10}O_5)_n$, solubles dans l'eau et dextrogyres, qui sont issus d'une transformation de l'amidon [101], sous forme de poudre blanche, brune ou jaune.
- **Le triphosphate de sodium (STPPNa)** : Le triphosphate de sodium (STP), également le tripolyphosphate de sodium (STPP), ou le tripolyphosphate (TPP) est un composé inorganique de formule $Na_5P_3O_{10}$. C'est le sel de sodium du penta-anion polyphosphate, qui est la base conjuguée de l'acide triphosphorique [102]. Il s'agit d'une poudre blanche souvent désignée comme un agent de réticulation, Responsable de la formation des liaisons entre les polymères qui seront utilisés pour encapsuler le principe actif.

b. Les solvants :

- **Dichlorométhane (DCM)** : Le chlorure de méthylène, également dénommé dichlorométhane (DCM), formule chimique CH_2Cl_2 est un composé organochloré volatil, polaire, miscible avec de nombreux solvants organiques. Il est couramment utilisé comme solvant pour les réactions/extractions organiques également utilisé dans la fabrication de médicaments et de pesticides [103].
- **EBEG** : Les résultats des analyses effectuées par spectrophotométrie UV-visible et par HPLC ont révélé que l'acide gallique et l'acide ellagique, composants actifs de l'écorce de grenade, sont les plus abondants dans l'extrait brut d'écorce de grenade (EBEG), de ce fait on n'a adopté EBEG pour l'encapsuler et dans la formulation de la pommade.
- **Les tampons** : On prépare la solution acide HCL et la solution basique NaOH :

➤ Solution d'acide chlorhydrique 0,1 N dans un volume de 100ml :

On prélève 0.83 ml de la solution concentré de HCl à 37% de pureté dans une fiole de 100ml, on complète avec l'eau distillée au trait de jauge.

➤ Solution de NaOH 0,1 N dans un volume de 100ml :

On dissout exactement la prise d'essai d'une masse de 0,4082g de NaOH pesée avec la balance analytique à ± 0.1 mg, dans une fiole de 100ml et on complète au trait de jauge avec l'eau distillée.

- ✓ **Préparation tampon pH = 4** : Le pH de l'eau distillée (6.28), on réajuste la valeur du pH en ajoutant quelques gouttes de solution HCl à 0.1N (0.22 ml) pour obtenir un pH= 4.
- ✓ **Préparation tampon pH=8** : On ajoute à l'eau distillé de pH=6.20 quelque goutte de NaOH jusqu'à arriver à ph=8.
- ✓ **Préparation tampon ph=6** : On ajoute à l'eau distillé de pH= 6.20 quelque goutte de NaOH jusqu'à arriver à Ph=6

III.5.2. Optimisation des paramètres de préparation des microparticules

L'objectif de cette étude est de déterminer les conditions optimales de préparations des microparticules par l'utilisation de la méthode des plans d'expériences (plan factoriel). On a d'étudier trois facteurs différents, la dose de PA, le rapport de polymère, le pH. Les variables codées sont présentées dans le **tableau III.3**. Et La matrice du plan d'expérience est représentée dans le **tableau III.4**.

Tableau III.3 : Variables codées et réelles des facteurs.

Facteur indépendant	Niveau		
	-1	0	1
Dose de PA en mg /ml(X1)	0.222	0.444	0.666
Rapport de polymère(X2)	4	8	12
pH (X3)	4	6	8

Tableau III.4 : Matrice du plan d'expérience factoriel pour les essais de micro-encapsulation de l'extrait brut de l'écorce de grenade.

Essai	X1	X2	X3	Dose(mg/ml)	V(ml)	RP (Dex/PEG)	PH
1	-1	-1	-1	0.222	0.5	4 (600/150)	4
2	1	-1	-1	0.666	1.5	4 (600/150)	4
3	-1	1	-1	0.222	0.5	12 (600/50)	4
4	1	1	-1	0.666	1.5	4 (600/150)	4
5	-1	-1	1	0.222	0.5	4 (600/150)	8
6	1	-1	1	0.666	1.5	4 (600/150)	8
7	-1	1	1	0.222	0.5	12 (600/50)	8
8	1	1	1	0.666	1.5	12 (600/50)	8
9	0	0	0	0.444	1	8 (600/75)	6
10	0	0	0	0.444	1	8 (600/75)	6

III.5.3. Protocole expérimentale pour la micro encapsulation :

- a. **Phase dispersée** : On fait dissoudre dans un erlenmeyer 600 mg de dextrine, on ajoute 10 ml de DCM à l'aide d'une éprouvette de 20 ml, on laisse le mélange sous agitation (500tour/min), pendant 5 min pour bien homogénéiser la solution puis on l'ajoute PA à différents dosages pour chaque essaie (voir **Tableau.III.4**) (**Figure III.11**).

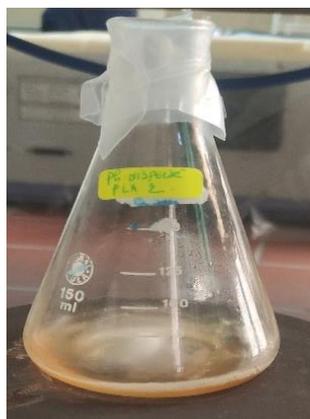


Figure III.11 : La phase dispersée.

- b. **La phase continue** : On fait dissoudre dans un erlenmeyer propre les différentes masses de polymère PEG (suivi plan expérience), on l'ajoute 20ml de tampon à différentes ph (voir plan expérience) on le laisse sous agitation pendant 2 min puis on l'ajoute 0.2 g de STPPNa (**Figure III.12**).

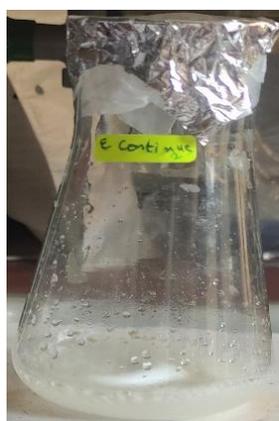


Figure III.12 : La phase continue.

- c. **Emulsification** : on verse goutte à goutte la phase dispersée dans la phase continue pendant agitation pour but de formé les microsphères (**Figure III.13**), après cela on laisse la solution sous agitation 600 tour/ min à température ambiante pendant 1 heure et demis pour former une simple émulsion. Après 2h on récupère deux couches. Ensuite, on filtre l'émulsion à l'aide de papier wattman (**Figure III.14**) puis on récupère le filtrat dans un tube bien fermé qui sera dosé par UV- visible (dosage polyphénols totaux et dosage flavonoïdes totaux), et le liquide qui est

sous forme de suspension laiteuse qui reste dans le papier wattman va être laissé séchés à l'aire libre après cela, nous avons broyer la matière sèche dans un mortier jusqu'à l'obtention des microsphère (Figure II.15) et (Figure II.16).



Figure III.13 : mélange de deux phases.



Figure III.14: processus de filtration.



Figure III.15 : la poudre après séchage de filtrats.



Figure III. 16 : Les microsphère obtenu.

III.5.4 : Techniques de caractérisation :

III.5.4.1. Essais de caractérisation par le spectrophotomètre UV-visible

a. Polyphénols Totaux

Pour chaque essai, nous avons pris 0,4 ml de l'échantillon (dilué 10 fois ou 100 fois). Ensuite, nous avons ajouté 2 ml de solution folin-Ciocalteu et 1,6 ml de solution Na_2CO_3 à la solution diluée, puis nous avons agité le mélange et bien fermé le tube, le recouvrant d'aluminium. Le tube a ensuite été incubé pendant 2 heures. Après cela nous avons mesuré les absorbances à 765 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre UV-visible, en les comparant à un blanc (1.6 ml de solution Na_2CO_3 mélangé avec 2 ml de folin-Ciocalteu).

- **Dilution des échantillons filtrés :**

- **La dilution des filtrats (10F) :** 0.4 ml de filtrats mélangés avec 1.6 de Na_2CO_3 et 2 ml de folin-ciocalteu (c'est juste le premier essai qui diluée 10 fois).

- **La dilution des filtrats (100 fois) :** Nous avons d'abord réalisé une première dilution en mélangeant 0,4 ml de l'échantillon filtré avec 9,6 ml d'eau distillée. Ensuite, pour la deuxième dilution, nous avons prélevé 0,4 ml de l'échantillon filtré dilué 10 fois, que nous avons mélangé avec 1,6 ml de Na_2CO_3 et 2 ml de folin-Ciocalteu dans un tube à essai (9 échantillons ont été dilués 100 fois).



Figure.III.17 : Schéma de dosage des essais de l'encapsulation de l'écorce de grenade.

b. Flavonoïdes Totaux

Dans chaque essai, 0.4 ml de filtrat est combiné dans un tube à essai avec 2 ml de solution AlCl_3 . Après une incubation de 15 minutes, l'absorbance est mesurée à 430 nm par rapport à un blanc constitué de 0.4 ml de méthanol mélangé avec 2 ml d' AlCl_3 . Le facteur de dilution des filtrats après l'ajout de 2 ml d' AlCl_3 est de 6.



Figure.III.18 : Schéma de dosage des flavonoïdes essais de l'encapsulation de l'écorce de grenade.

III.5.4.2. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC :

Le protocole expérimental, y compris les standards et la phase mobile ainsi que toutes les conditions opératoires sont identiques à ceux déjà adoptée pour la caractérisation des extraits. D'où les seules étapes à faire c'est la préparation des Vial à savoir le remplissage de 2 ml de chaque filtrat des 10 essais de la micro-encapsulation réalisée dans 10 Vial. Par suite ces échantillonne sont analyses par HPLC.

D'après les résultats des analyses UV-visible et HPLC on a conclu que l'essai 6 as le taux d'encapsulation le plus élevé parmi les 10 essai, d'où nous avons utilisé les microsphères de cet essai

pour les tests antibactériens ainsi que pour la formulation de la pommade et les autres tests (infrarouge, la cinétique de libération).

III.6. Activité antibactérienne :

Ces tests ont été réalisés à laboratoire d'Ecologie Microbienne, bloc 9, sous la supervision de la doctorante de M. Abdelaziz. T. Notre étude a porté sur l'évaluation de 2 souches qui ont été fournies par le même laboratoire de référence qui sont les suivantes :

- *Staphylococcus aureus* de référence ATCC6538
- *Escherichia coli* de référence ATCC 8739

Pour estimer l'activité de notre extrait contre ces souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), nous avons utilisé deux méthodes :

- a. **Méthode de diffusion des disques :** La méthode de diffusion des disques est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne. Dans cette méthode, les paramètres tels que le volume placé sur les disques de papier, l'épaisseur de la couche de gélose et si un dissolvant est employé varient considérablement entre les études [104].

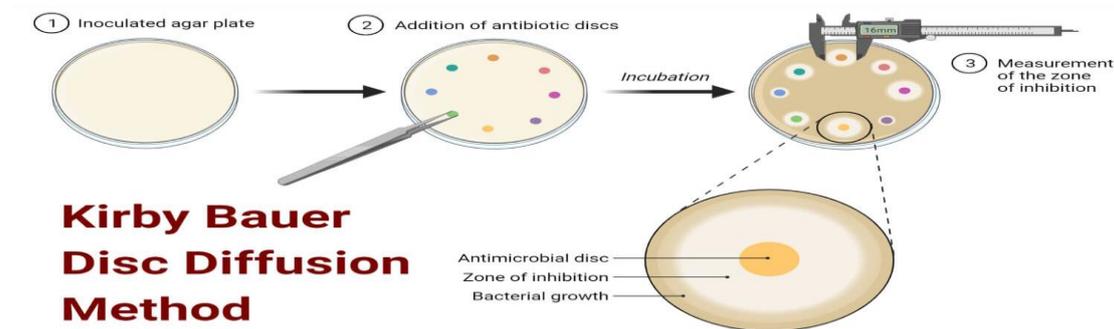


Figure III. 19 : Principe de la méthode de diffusion sur disques [105].

- b. **Méthode des puits (la technique de diffusion sur gélose) :** C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet anti microbien, elle est aussi appelée : la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs [106].

Le principe de cette méthode est similaire à celui de la méthode des disques : il consiste à réaliser des puits dans la gélose de 2.5 mm de Profondeur, qui sont par la suite remplis d'extraits ou d'antibiotique à tester [107].

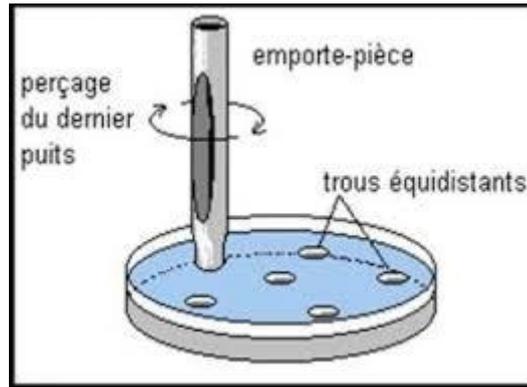


Figure III. 20 : Méthode des puits [108].

- c. **La gélose utilisée pour préparer le milieu physiologique** : est le Mueller-Hinton c'est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques et sulfamides. Sa formulation est conforme aux recommandations du CLSI, du CA-SFM ou de l'EUCAST. Ils se constitue de Peptone, Extrait viande, Amidon et Agar [109]. Avant la dissolution, ils se présente sous forme de poudre rouge brique après la dissolution elle se solidifie en forme d'un gel de gélose.



Figure III.21 : Mueller-Hinton sous forme solide.

• **Mode opératoire :**

- **Préparation de milieu physiologique** : 38 g/L de Gélose Mueller-Hinton Agar a été dissoute dans 1 L d'eau distillée dans un Erlen de 3 L, et on laisse la solution sous agitation et chauffage jusqu'à dissolution totale de la poudre, après la solution est transférée dans des flacon, ces derniers ont été autoclavés à une température de 121°C pendant 15 minutes. Suivant cela, la solution est versée dans un sérié des boite pitre stérilisé (12 boites est pour la méthode des disques et 12 boites pour la méthode des puit) à l'intérieur d'une hotte. Ensuite, elle est laissée à solidifier.

NB : pour la méthode des puits on vers quelque goutte de milieu physiologique puis laissées à solidifier. Après cela un Embout est positionné au centre de la boîte pour former un puit, ensuite en remplis avec le milieu pour un épaisseur de 4 mm et on laisse jusqu'à solidification pour retirer l'Embout. Et concernant la méthode des disques en verser le milieu à la boîte direct pour un épaisseur de 4 mm



Figure III. 22 : préparation du milieu physiologique.

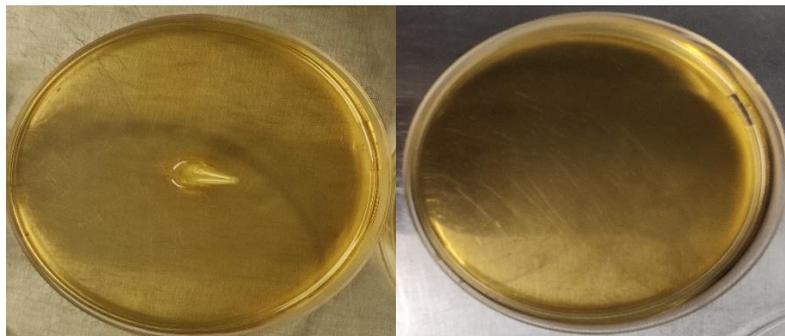


Figure III. 23 : présentation de la méthode des puits et des disques respectivement.

- **Préparation de l'inoculum bactérien :** Pour préparer l'inoculum des deux souches de bactérie (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), nous avons prélevé quelque colonie de bactérie à l'aide d'un inoculateur, après cela nous avons immergées ce dernier dans un tube à essai rempli à moitié d'eau physiologique stérile (NaCl à 0,9 %), ensuite on a bien mélangé. C'est le même principe pour les deux souches.
- **Préparation des dilutions d'extraits des plantes :**
 - Les microsphères : 50mg de la poudre des microsphères ont été dissout avec 1 ml d'eau stérilisé dans un tube Eppendorf.
 - EBEG : 0.21 ml été diluée avec 1 ml de l'eau stérile dans un tube Eppendorf.
- **Ensemencement :** En fait plongé un écouvillon stérile dans l'inoculum bactérien et en le pressant sur la paroi interne du tube, pour que l'écouvillon ne soit pas trop chargé. Ensuite,

nous avons frotté ce dernier de haut en bas en lignes serrée sur la surface totale de la gélose. Nous avons procédé de la même manière pour le reste des boîtes de Pétri en recharge l'écouvillon à chaque fois.



Figure III.24 : Procédure d'ensemencement.

- **Application des disques et remplissage des puits :** Des disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) stérilisée ont été disposés aux milieux de la culture, en appuyant légèrement à l'aide d'une pince stérilisées, puis à l'aide d'une micropipette de 100 μL on décharge 20 μl depuis chaque dilution de l'extrait (EBEG et les microsphères) au centre du disque. Pour les puits 40 μl a été versée dans les puits à l'aide d'une micropipette de 100 μl , après cela ces boîtes sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heure. (2 témoins pour les deux bactéries testées avec un antibiotique d'eau stérilisé pour le même volume que les principe active dans deux disque différent).

NB : tout le travail a été effectué aux milieux de deux bec bunsen pour éliminer l'intervention d'autres bactéries.

- **Lecture des résultats :** l'activité de l'extrait a été évaluée en fonction du diamètre des halos d'inhibition (la norme est de 7 mm) contre la croissance des souches des bactéries. Le diamètre doit être ≥ 7 mm pour considérer qu'il y a une activité antibactérienne.

III.7. Formulation de la pommade :

III.7.1. Composition chimique et rôle des constituants de la pommade :

- **EBEG (forme liquide et des microsphères) :** principe active de la pommade.
- **Oxyde de zinc :** Sous forme de poudre de couleur blanche, inodore et insipide. Largement utilisé dans les pommades, les crèmes et les lotions en tant qu'agent desséchant potentiel pour traiter diverses infections cutanées. Ainsi que pour protéger la peau contre les coups de soleil

et les dommages cellulaires causés par les rayons UV [110]. Utilisée en tant qu'excipient en faveur de séchage de la zone traitée pour accélérer le processus de cicatrisation.

- **Vaseline pure** : C'est la base de la pommade en tant que diluant (excipient), choisie pour plusieurs raisons, principalement la protection et l'hydratation de la peau, ainsi que pour améliorer son efficacité.
- **Huile de sésame** : C'est un agent hydratant et nourrissant pour la peau, améliorant l'odeur et augmentant la capacité d'absorption des principes actifs dans la pommade.

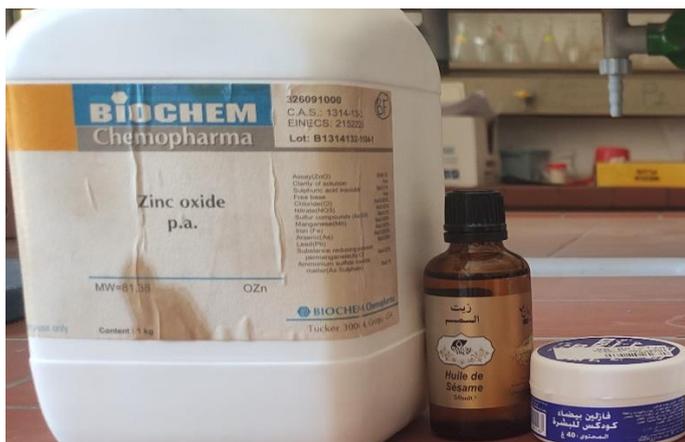


Figure III.25 : Les excipients utilisés pour la formulation de la pommade.

- **Mode opératoire :**
 - a. **Formulation de la pommade de EBEG** : Dans un mortier on mélange d'abord 2 g de vaseline avec 1 goutte d'huile de sésame à l'aide d'une cuillère en plastique, puis on ajoute 100 mg d'oxyde de zinc, on mélange à nouveau. Après cela, on verse un volume de 0.63 ml de EBEG dans la pommade et on mélange jusqu'à homogénéiser et à la fin, la préparation est transférée dans une boîte sèche préalablement nettoyée à l'éthanol.



Figure III.26 : Préparation de la pommade EBEG.



Figure III.27 : Pommade EBEG.

- b. Formulation de la pommade des microsphères :** 2 g de vaseline plus 1 goutte d'huile sésame et 100 mg d'oxyde de zinc, bien mélanger dans un mortier à l'aide d'une spatule en plastique, après homogénéisation de la pâte, 150 mg des microsphères sont incorporés et mélangés de nouveau jusqu'à l'obtention d'une pommade, puis elle est transférée dans une boîte sèche après nettoyage avec l'éthanol.



Figure III.28 : Pommade des microsphères au cours de préparation.



Figure III.29 : Pommade des microsphères préparée.

- c. Formulation de la pommade témoin :** Le même protocole expérimentale et les mêmes excipients que les deux pommades précédentes, mais sans ajouter d'extrait ou les microsphères.



Figure III.30 : Préparation de la pommade témoin. **Figure III.31** : pommade témoin préparé.

III.7.2. Activité antibactérienne des pommades :

Le même protocole expérimental fait pour tester l'activité antibactérienne de l'extrait (EBEG et la poudre des microsphères de l'essai 6), est également adoptée pour les pommades.

- **Mode opératoire**

50 mg de chaque pommade est dissout avec 1 ml d'eau stérile dans un tube Eppendorf, ensuite à l'aide d'une micropipette de 100 μ L on décharge 20 μ L depuis chaque mélange de pommade au centre du disque des boîtes à pitres. Pour les puits 40 μ L a été versée dans les puits à l'aide d'une micropipette de 100 μ L, après cela ces boîtes sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures. (2 témoins pour les deux bactéries testées avec un antibiotique alcool et la pommade témoin pour le même volume des autres pommades). La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions.

III.8. Etude de la cinétique de libération :

Nous avons engendré trois éléments pour étudier ce sont La poudre des microsphères contenant l'extrait, la pommade formulée à base des microsphères et la pommade formulée à base EBEG (tous les éléments sont de l'essai 6).

III.8.1. Préparation du milieu physiologique :

Le milieu physiologique dermique (pH=5.8) a été préparé en utilisant une solution tampon de phosphate par dissolution de 27,218 g de Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) dans 250 ml d'eau distillée, mélange à 18 ml de la solution NaOH (0.2M), et on complète à 1 litre l'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à 5.8 avec la solution NaOH (0.2M), par contrôle du pH avec un pH-mètre étalonné de type Milwaukee (**Figure III.27**).



Figure III.32 : milieu physiologique étalonné à PH =5.8.

L'essai de dissolution est réalisé dans un dissolu-test à godet de 900 ml de type (ERWEKA GmbH Pitterstr.45 D-6325 Langen, Germany) muni d'un système d'agitation dans lequel est introduite la solution du milieu physiologique maintenu à une température de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, et à une agitation de 50 tr/min (**Figure III.28**).

- ✓ **Les microsphères** : On dissout une masse de 50mg des microsphères de l'essai 6 de la micro encapsulation dans le godet des milieu physiologique (**Figure III.29**), et on effectue des prélèvements de 1ml à l'aide d'une seringue de 5ml suivant des intervalles de temps choisis, en versant à chaque fois 1ml du milieu physiologique d'après le tableau suivant. Les prélèvements sont filtrés par filtra-seringue.
- ✓ **La pommade à base de EBEG, et des microsphères** : 1 g de la pommade été utilisée dissoute dans le godet de milieu physiologique après cela le même protocole des micro sphères est adoptée pour cette étude.

À la fin de chaque étude on procède à la mesure de la concentration (diffusion) des polyphénols et flavonoïdes au coure de la cinétique de libération par dosage spectrophotométrie UV-visible, en adaptant le même mode opératoire que nous avons déjà fait préalablement.

Tableau III.4. Temps et le volume de la cinétique de libération de principe actif.

T (heure)	1er heure						2ème heure			3ème heure		4ème heure	
T (min)	10	20	30	40	50	60	20	20	20	30	30	30	30
Volume prélever (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V milieu physiologique (1ml) PH=5.8	1												



Figure III.33 : Installation du dissolu test et mise en œuvre pour l'étude de la cinétique de Libération.



Figure III.34 : Avant et après dissolution des microsphères.



Figure III.35 : Avant et après dissolution de la pommade EBEG.



Figure III.36 : Avant et après dissolution de la pommade à base des microsphères.

III.9. Caractérisation par infrarouge IRFT :

La spectrophotométrie infrarouge utilisé dans notre travail est de modèle SHIMADZU FT IR-8400S, piloté par un ordinateur muni d'un logiciel.

- **Protocole expérimentale**

Les échantillons analysés : Les microsphères de l'essai 6, TPPNa et poudre sèche de végétale, dextrine, PEG, EBEG.

Pour la préparation des pastilles 100 mg de KBr ont été soigneusement mélangés afin d'assurer une distribution uniforme et homogène avec 5 mg des microsphères et 2 mg de chaque de TPP et poudre sèche de végétale, dextrine, PEG. Ensuite le mélange de chaque pastille été placé dans un moule de presse, lequel a été soumis à une pression de 70 kN par une presse qui a été connecté à une pompe pour une durée de deux minutes afin de dégazer la poudre en éliminant l'air et l'humidité ensuite les pastilles formées ont été stockées dans un petit morceau d'aluminium pour fait passer par infrarouge.

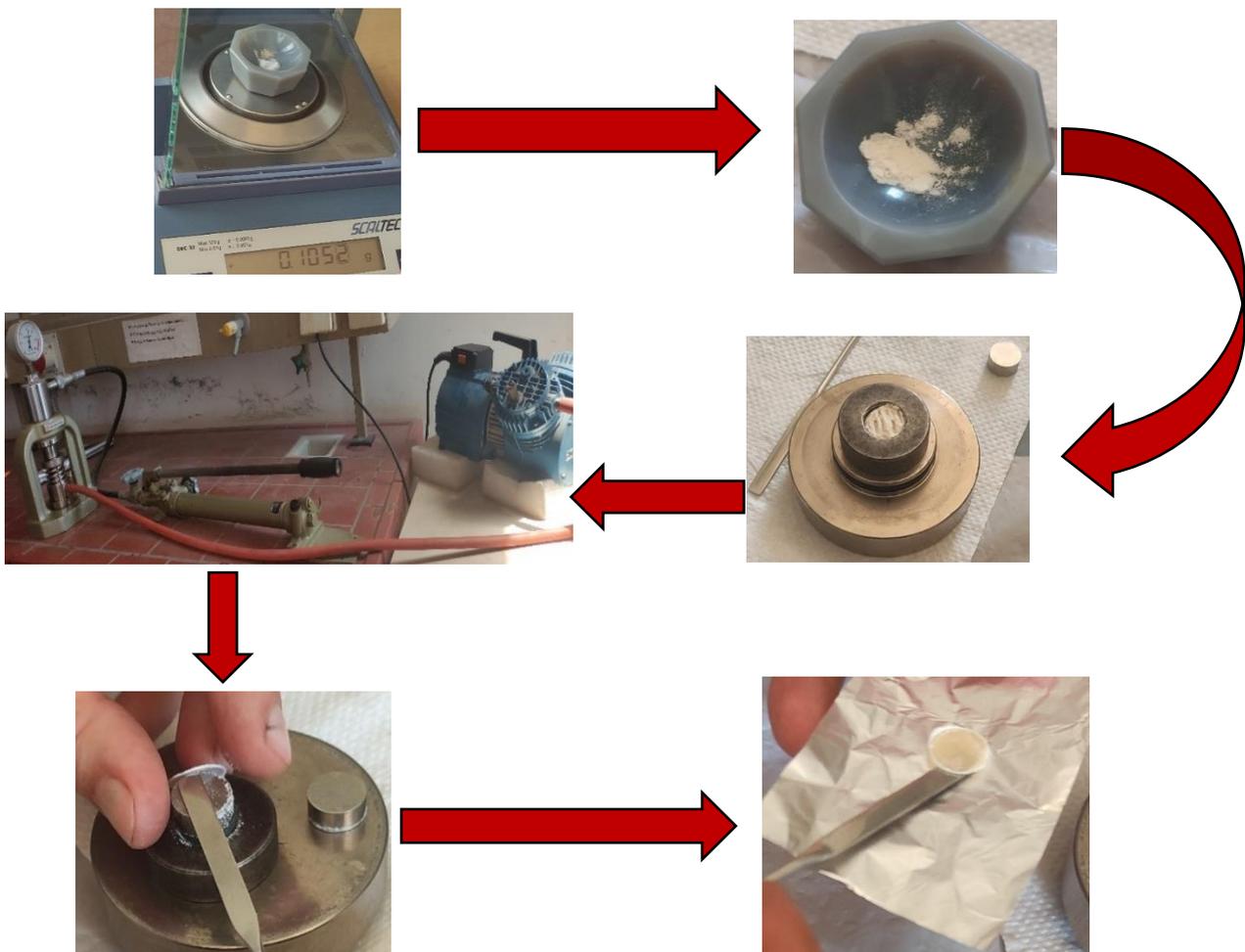


Figure III.37: Schéma de la procédure de préparation des pastilles.

III.10. Observation microscopique :

Dans cette section nous effectuons l'analyse morphologique des microsphères des essais de meilleur taux d'encapsulation parmi les trois niveaux de pH choisis : essai 4 de pH 4, essai 6 de pH 6 et essai 9 de pH 8. Cette analyse a été faite avec le microscope optique (**Figure III.38**) avec différents grossissements $\times 100$, $\times 400$ et $\times 1000$, au CRAPC de l'université de Bejaia. L'objectif de l'observation est d'évaluer la taille, la morphologie et l'homogénéité de la distribution des microsphères, pour les trois essais.



Figure III.38 : Microscope optique.

Chapitre IV : Résultats et discussion

Ce chapitre est consacré à la présentation et à la discussion des résultats de notre travail, fondé sur l'extraction et l'identification des composés phénoliques des écorces de fruit de *Punica Granatum*, et à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de ces derniers. A cet effet, l'interprétation des résultats des essais de l'encapsulation et de l'analyse par HPLC, nous permet de déterminer le taux d'encapsulation des composés phénoliques et des flavonoïdes. L'objectif final est de formuler une pommade cicatrisante et anti-bactérienne destinée à une application dermique, prouvées par des tests microbiologiques sur des souches de *Escherichia Coli* et de *Staphylocoques Aureus*. On termine ce travail par une étude de la cinétique de libération des métabolites secondaires, dans un milieu physiologique dermique.

IV.1. Extraction

IV.1.1. Rendement massique des extraits :

Le rendement de l'extraction fractionnée dans les différents solvants de polarité croissante (EP, DCM, MeOH, Eau) est exprimé en pourcentage de masse d'extrait sec, après évaporation totale des solvants et séchage à 60°C pendant 2h dans une étuve, par rapport à la masse initiale de matière végétale. Un exemple de calcul du rendement pour l'extrait brut (EBEG) est donné par la relation qui suit :

$$R \% = \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{éch}}} \times 100 = \frac{16.224}{40} \times 100 = 40.56\%$$

Tableau. IV.1 : Couleurs et rendements massiques des extraits d'écorce de grenade.

Type d'extrait	Aspect de la couleur	Le rendement
EBEG	Grenat	40.56%
EEPEG	Transparent	0.49%
EGDCM	Orange clair	4.99%
EEGA	Rouge foncé	16.11%

Les résultats du **Tableau. IV.1** montrent que l'écorce de grenade est riche en métabolites secondaires ce qui est cité dans la partie théorique. Les rendements des extraits les plus élevés des substances bioactives sont très solubles dans les solvants plus polaires (méthanol, eau distillée) que dans le solvant apolaire (éther de pétrole) ou faiblement polaire (Dichlorométhane). Cette conclusion est appuyée par les résultats des rendements obtenus, ou la proportion la plus élevée est celle de EBEG (40.56%), et relativement moins élevée dans l'extrait hydro alcoolique EEGA (16.11%), en comparaison avec l'extrait apolaire (EEPEG) et moins polaire (EGDCM) avec des rendements respectifs de 0.49% et 4.99%.

IV.2. Etude phytochimique

IV.2.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible

IV.2.1.1 Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux des extraits sont quantifiés par la méthode de Folin- Ciocalteu. La Figure IV.1 présente une courbe d'étalonnage de l'acide gallique établie d'après les résultats de mesures par spectrophotométrie UV-visible, à une longueur d'onde de 765 nm, révélant un coefficient de régression linéaire $R^2=0.9925$, et une équation de courbe de forme : $Y= 0.0887 X + 0.0111$.

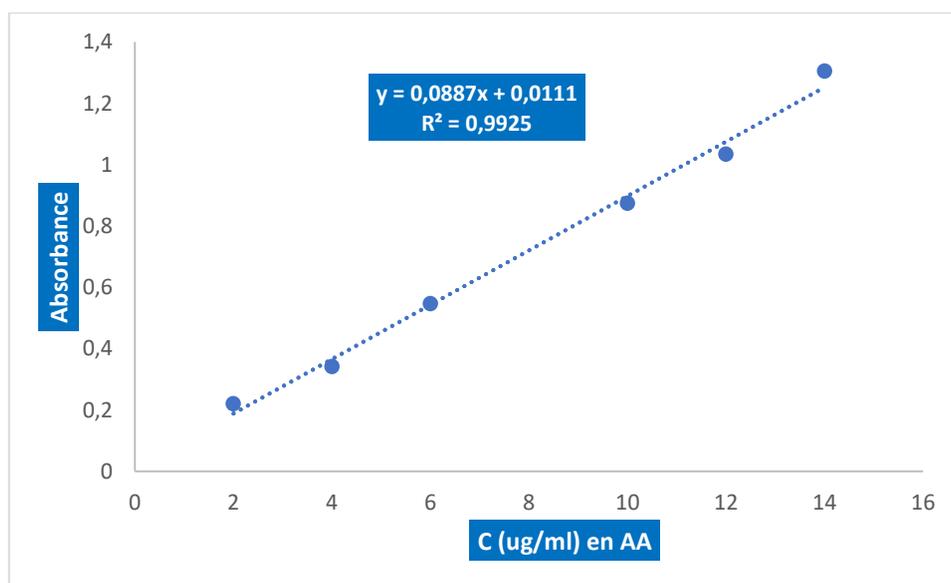


Figure IV.1: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Les résultats de dosage des polyphénols totaux des extraits de *Punica Granatum* montrent une richesse en métabolites secondaires, cependant les quantités varient d'un extrait à l'autre.

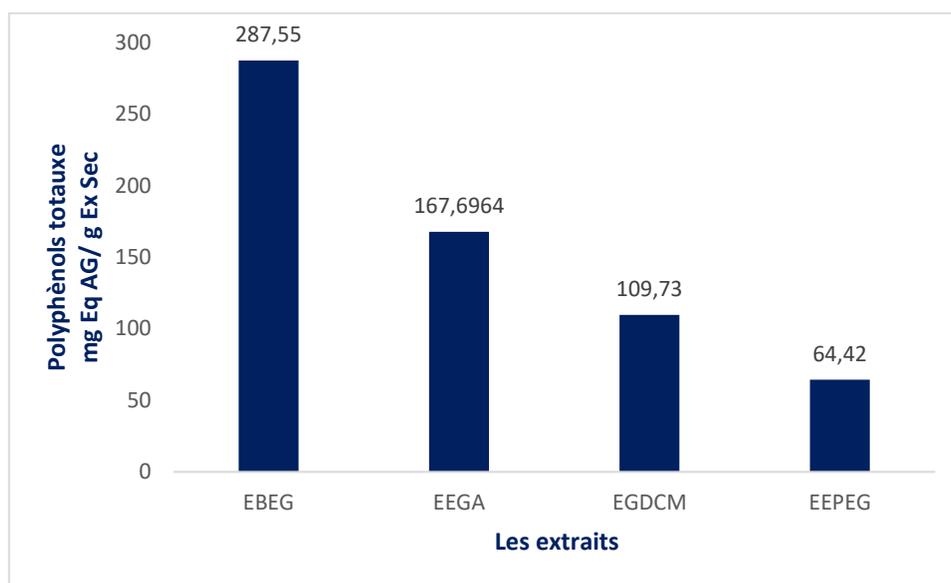


Figure IV.2: Histogramme des teneurs de polyphénols totaux des différents extraits d'écorces de grenade (*Punica Granatum*).

➤ **Présentation des résultats :**

La figure IV.2 présente un Histogramme des teneurs en polyphénols totaux des différents extraits d'écorces de grenade (EBEG, EEPEG, EGDCM et EEGA). L'extrait brut dans le méthanol et l'eau, EBEG montre la plus forte teneur en polyphénols (**287.55 mg Eq AG/ g Ex Sec**), suivi par l'extrait hydroalcoolique EEGA (**167.69mg Eq AG/ g Ex Sec**) dans l'éthanol et l'eau, vient après l'extrait moins polaire dans le dichlorométhane EGDCM (**109.72 mg Eq AG/g Ex sec**), et enfin l'extrait apolaire dans l'éther de pétrole EEPEG, qui a donné la teneur minimale en polyphénols (**64.42 mg Eq AG/g Ex sec**).

➤ **Explication des résultats :**

L'extraction dans l'éther de pétrole a donné le pourcentage le moins important parmi les extraits. Ce résultat est en accord avec la nature chimique des polyphénols, qui sont des composés polaires et ne sont donc pas très solubles dans les solvants apolaires. Ce qui explique pourquoi en particulier l'extrait EBEG contient une quantité relativement élevée de polyphénols. Cela signifie que cette variété de grenade (WONDERFUL) est très riche en polyphénols spécifiques, comme l'acide gallique et les tannins galliques. C'est le cas aussi de l'extrait EEGA qui possède une teneur assez élevée en polyphénols. Par contre, l'extrait dans le dichlorométhane, solvant peu polaire et dans l'éther de pétrole qui est un solvant apolaire, ont donné de faibles teneurs en polyphénols. Ce qui montre que ces derniers ne sont pas adaptés à l'extraction de ces composés très polaires.

IV.2.1.2. Dosage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont été quantifiés en utilisant la méthode de complexation avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3). Les absorbances des étalons de quercétine ont été mesurées à une longueur d'onde de 430 nm, la courbe d'étalonnage est présentée dans la **figure IV.3** et son équation est : $Y=0.042X + 0.2039$. Le coefficient de corrélation est $R^2=0.9882$.

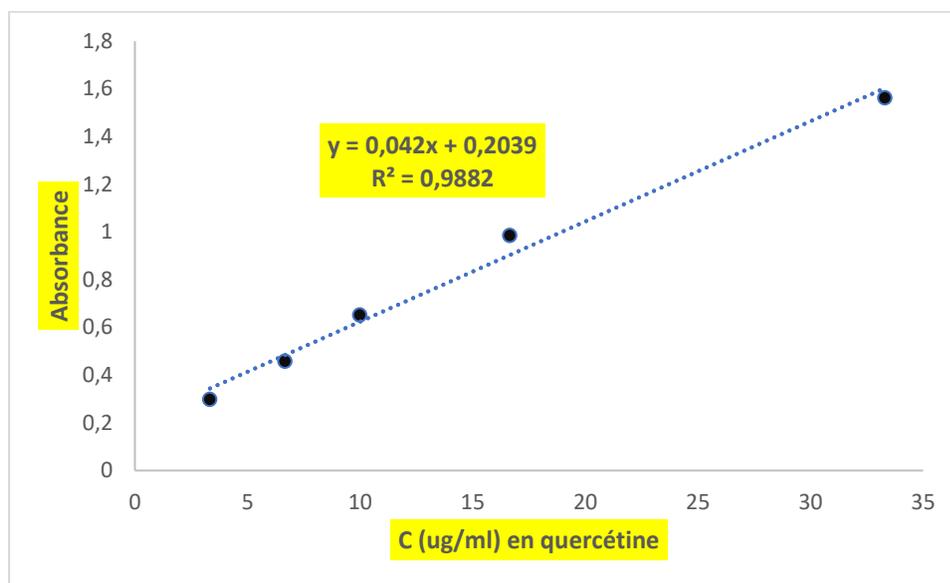


Figure IV. 3 : Courbe de dosage des flavonoïdes totaux.

En utilisant cette courbe d'étalonnage, il a été possible de déterminer la quantité totale des flavonoïdes dans l'écorce de *Punica Granatum*, exprimée en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec.

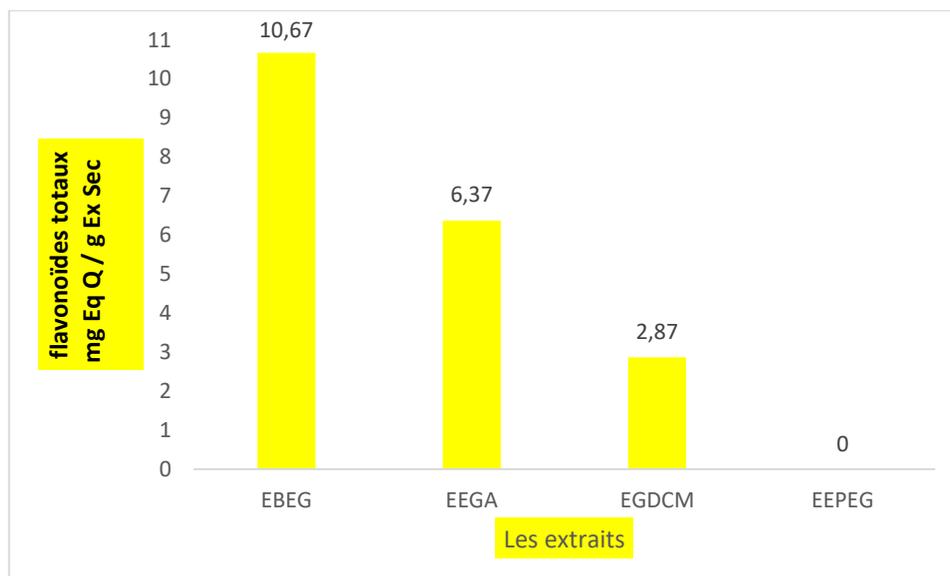


Figure IV.4: Histogramme de variation des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits d'écorces de *Punica Granatum*.

➤ **Présentation des résultats :**

Les résultats obtenus montrent une variation des teneurs en flavonoïdes entre les divers extraits. L'extrait brut (EBEG) se distingue en révélant la teneur maximale en flavonoïdes (**10.67 mg Eq Q / g Ex Sec**), suivi de l'extrait hydroalcoolique (EEGA) à **6.37 mg Eq Q/g Ex** qui reste inférieure à celle de EBEG. On note que la teneur en flavonoïdes diminue dans l'extrait de dichlorométhane à une valeur de **2.87 mg Eq Q / g Ex Sec**. Par contre, l'extrait EEPEG contient très peu ou pas de flavonoïdes.

➤ **Explication des résultats :**

La concentration élevée en flavonoïdes dans l'extrait brut EBEG peut être attribuée à l'efficacité de l'extraction par combinaison du méthanol et de l'eau. La teneur de flavonoïdes dans EEGA qui est assez importante indique une extraction puissante, mais moins que celle dans EBEG. Ce qui montre une extraction partielle ou spécifique de certains types de flavonoïdes. En ce qui concerne EGDCM, on remarque une teneur en flavonoïdes plus faible (2,87), et l'absence de flavonoïdes dans EEPEG (0). Ceci confirme que les solvants peu polaires ou apolaires (dichlorométhane et l'éther de pétrole) ne sont pas efficaces pour extraire les flavonoïdes des écorces de grenade.

En conclusion, le taux de flavonoïdes est lié aux nombreux facteurs (type de végétale et l'espèce, les conditions de croissance et la méthode d'extraction, les solvants utilisés).

IV.2.2. Activité antioxydante par la méthode de DPPH°

Tableau IV.2 présente les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH° à deux concentrations pour deux volumes variables de 100 µl et 800 µl, permettant ainsi d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait d'écorce de grenade. L'activité antioxydante est proportionnelle au taux d'inhibition. Plus celui-ci augmente, plus l'activité antioxydante est forte.

Tableau IV.2 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° dans les extraits des écorces de *Punica Granatum*.

Extraits	EBEG	EEGA	EGDCM	EEPEG
Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH. % (100ul)	80.083	63.21	91.15	85.89
Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH. % (800ul)	20.33	0	86.72	74.55

Pour 100µl de DPPH, on remarque que les taux d'inhibition sont plus élevés, contrairement à l'ajout d'une quantité plus élevée de DPPH (800µL). On constate une régression du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° pour la majorité des extraits quand la quantité s'élève de 100 µl à 800 µl, notamment pour EEGA, qui a un taux d'inhibition nul à 800 µl. On remarque aussi pour EBEG, que le taux d'inhibition diminue sensiblement de 80.08% à 20.33%, tandis que EGDCM et EEPEG exhibent une légère diminution et présentent donc les meilleures activités antioxydantes. En particulier pour EGDCM, les taux sont de 91.15% à 100 µl et de 86.72% à 800 µl, suivi de EEPEG avec un taux de 85.89% à 100 µl et de 74.55% à 800 µl. Cette variation en pourcentage d'inhibition est probablement due aux compositions chimiques spécifiques de chaque extraits et d'autre part à la saturation des interactions chimiques de ces derniers, qui abattent l'efficacité de l'inhibition des extraits à de grandes concentrations de DPPH. Les pourcentages d'inhibition élevés de EGDCM et de EEPEG sont liés à la présence de métabolites secondaires (tanins condensés et hydrolysables) malgré des teneurs faibles en acide gallique et en quercétine. Par contre, EEGA, EBEG qui possèdent de faibles pourcentages d'inhibition à 800 µl (0% dans EEGA), est expliquée par le fait de l'existence d'une interférence des solvants polaires utilisée lors de l'extraction (méthanol, éthanol et eau distillée) dans les interactions chimiques entre les composés actifs.

L'activité antioxydante peut être favorisée par plusieurs éléments, et une seule mesure ne donne pas un résultat précis. Une étude plus approfondie et des expériences additionnelles devraient être mises à profit pour bien comprendre ces résultats contradictoires et les mécanismes qui sont observés.

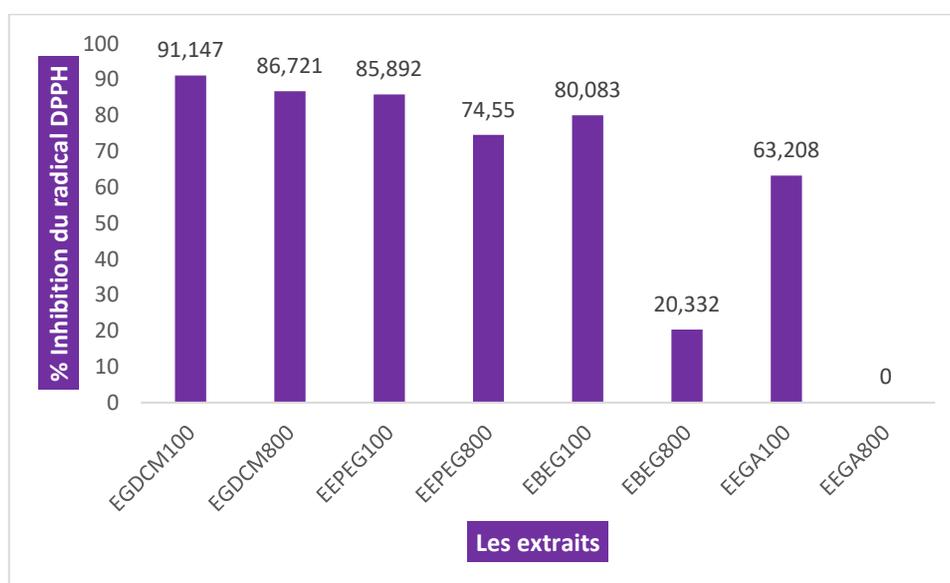


Figure IV.5: Histogramme de l'activité anti-oxydante et pouvoir d'inhibition du DPPH° par les extraits d'écorce de grenade (*Punica Granatum*).

IV.3. Caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Dans le but d'identifier les composés phénoliques des extraits d'écorce de grenade (EBEG, EGDCM, EEPEG) et de mieux les séparer, nous avons effectué une analyse par HPLC en sélectionnant comme standards deux composés phénoliques purs, l'acide gallique (AG) et la quercétine (Qr). Leurs temps de rétention sont mentionnés dans le **tableau IV.3** et ceux des extraits sont présentés dans le **Tableau IV.4**.

Tableau IV.3 : Les temps de rétention et aires des pics chromatographiques des standards par HPLC.

Standard	Temps de rétention (min)	Aire relative %
Acide gallique	1.673	71.868
Quercétine	4.942	141.486

Tableau IV.4: Temps de rétention et les aires des pics des métabolites secondaires identifiés dans les extraits par HPLC.

Métabolites secondaires	EBEG		EGDCM		EEPEG	
	Tr (min)	Aire (mAU.mn)	Tr (min)	Aire (mAU.mn)	Tr (min)	Aire (mAU.mn)
Acide gallique	1.578	1568.724	1.667	104.629	1.595	0.511
Acide ellagique	3.133	27.119	3.212	5.706	3.015	0.234
Flavonoïde 1	2.442	1.241	2.45	2.066	2.465	0.026
Flavonoïde 2	2.577	5.991	2.597	3.613	2.640	0.033
Flavonoïde 3	2.765	9.777	2.743	2.007	2.803	0.039
Flavonoïde 4	-	-	2.832	6.659	-	-
Flavonoïde 5 (Quercétine)	-	-	-	-	5.062	0.017
Flavonoïde 6	-	-	-	-	7.595	1.531

Les chromatogrammes des extraits de l'écorce de grenade (*Punica granatum*) obtenus par HPLC sont présentés sur la **Figure IV.3**, **Figure IV.4**, et ceux des standards sont répertoriés dans l'**Annexe II**. L'évaluation de ces extraits est faite en fonction des concentrations en polyphénols (acides gallique, acide ellagique) et en flavonoïdes (quercétine) en milligrammes par millilitre. La concentration dans chaque extrait est quantifiée puis calculée par l'équation d'étalonnage suivante :

$$C = \frac{\text{Aire (extrait)}}{\text{Aire (Standard)}} \times C_e \times F$$

A extrait : aire du pic (AG, AE ou Qr) sur le chromatogramme de l'extrait (mAU*min)

A standard : aire du pic du standard (AG ou Qr) sur le chromatogramme du standard (mAU*min)

C_e : concentration du standard (Quercétine : 0.2mg/ml, Acide gallique : 0.2mg/ml)

F : facteur dilution (10 fois pour Extrait brut, HA et DCM)

L'ensemble des concentrations calculées en polyphénols et flavonoïdes est illustré dans le **Tableau IV.5** et **Tableau IV.6** respectivement.

Tableau IV.5: Concentration en polyphénols des extraits d'écorce de grenade par HPLC.

Les extraits	Concentration en polyphénols (mg/ml)		
	Acide gallique	Acide ellagique	Polyphénols total
EBEG	43.6557	0.7568	44.41
EGDCM	2.9116	0.1587	3.07
EEPEG	0.01422	0.0065	0.0207

Tableau IV.6: Concentration en flavonoïdes des extraits d'écorce de grenade par HPLC.

Les extraits	Concentration en flavonoïdes (mg/ml)						
	Flav 1	Flav 2	Flav3	Flav4	Flav 5	Flav 6	Flav total
EBEG	0.0175	0.0846	0.1382	/	/	/	0.2404
EGDCM	0.0292	0.0511	0.0283	0.0941	/	/	0.2027
EEPEG	0.00036	0.00046	0.00055	/	0.00024	0.0216	0.02326

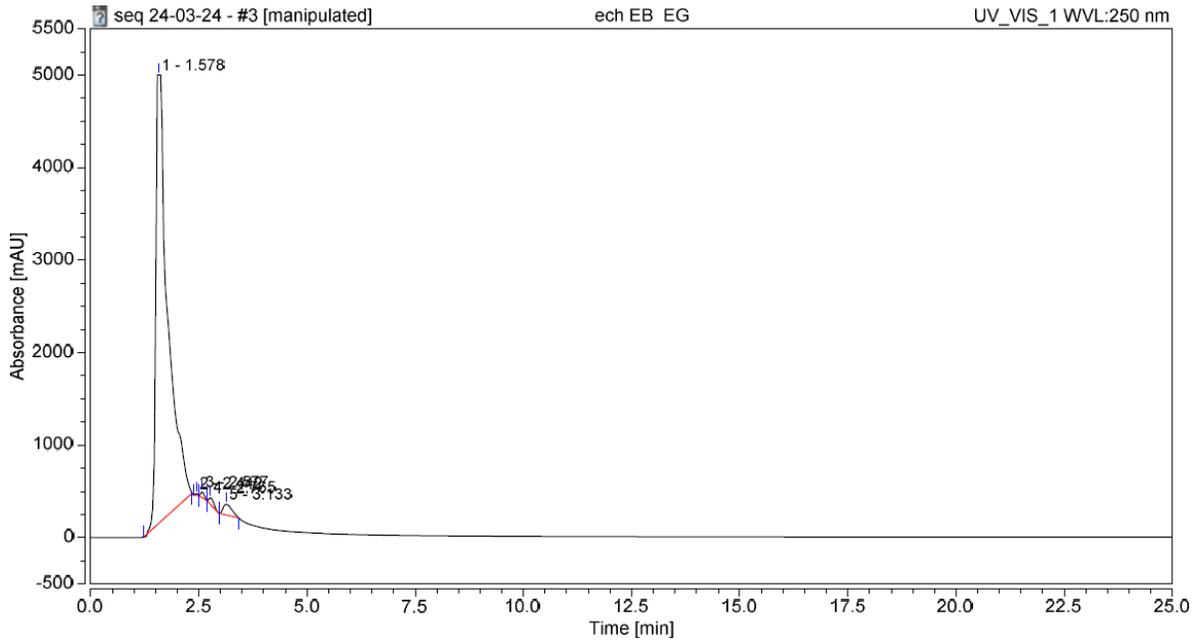


Figure IV.6 : Chromatogramme par HPLC de EBEG.

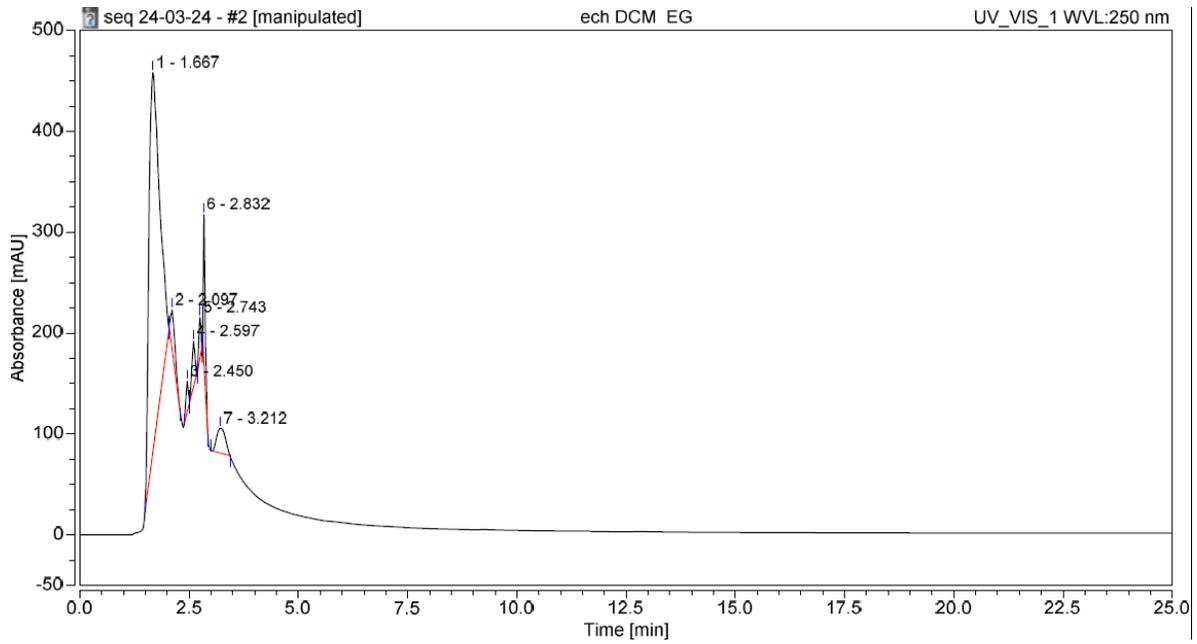


Figure IV.7 : Chromatogramme par HPLC de DCMEG.

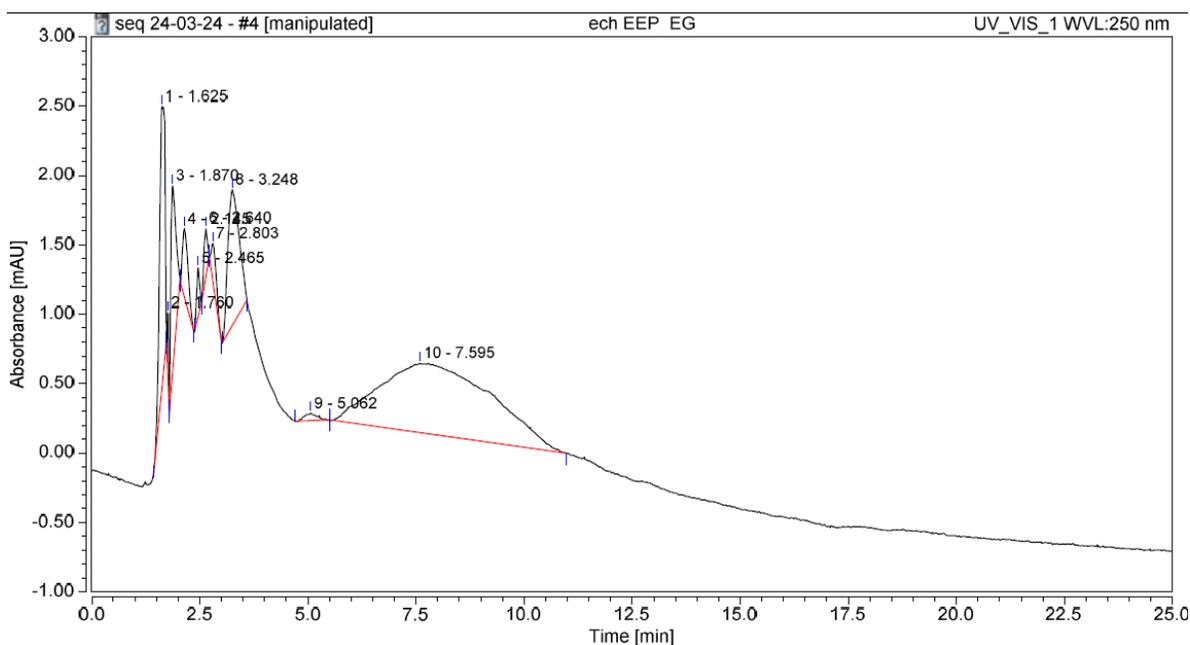


Figure IV.8 : Chromatogrammes par HPLC de EEPEG.

- **Explication des résultats :**

L'analyse de HPLC est effectuée pendant une durée de 25 minutes pour chaque extrait et standard. Les chromatogrammes obtenus révèlent la présence de plusieurs pics correspondant aux différents métabolites secondaires, notamment les polyphénols et les flavonoïdes. Les premiers pics correspondent aux molécules qui ont migré en premier dû à leur grande polarité (plus d'affinité vis-à-vis de la phase mobile) et à leur faible poids moléculaire. Dans notre étude, le premier pic est celui de l'acide gallique, avec un temps de rétention de 1,673 minute, suivi des pics des flavonoïdes entre 2,44 min et 2,83 min. Ensuite, vient le pic de l'acide ellagique, qui est le dimère de l'acide gallique, son temps de rétention est pratiquement le double de celui de l'acide gallique. Enfin, la quercétine apparaît avec un temps de rétention de 4,942 minutes, ce composé ayant une plus grande affinité pour la phase stationnaire de HPLC et un poids moléculaire plus élevé que les deux premiers composés et les premiers flavonoïdes. Ce qui correspond au principe de la séparation chromatographique en phase inverse.

Pour **EBEG**, un grand pic est observé dès le début de l'analyse avec un temps de rétention de 1.578 minutes, correspondant évidemment à l'acide gallique, suivi de petits pics. La concentration des polyphénols est importante dans cet extrait avec une valeur de 44,41 mg/ml (43,6557 mg/ml AG et 0,7568 mg/ml AE), et une concentration de 0,2404 mg/ml en flavonoïdes. Ces résultats indiquent une forte capacité antioxydante et potentiellement antibactérienne. En comparaison avec l'extrait **EGDCM**, on trouve qu'il est moins riche en polyphénols galliques avec un concentration égale 3,07 mg/ml (2,9116 mg/ml AG et 0,1587 mg/ml AE), et

d'une concentration faible en flavonoïdes 0,2027 mg/ml, a été trouvée malgré qu'il contienne une variété de flavonoïdes (4 types) qui n'existent pas dans l'EBEG. Cela peut indiquer une extraction sélective de certains flavonoïdes dans le solvant dichlorométhane. En ce qui concerne **EEPEG**, une concentration très faible en polyphénols galliques de 0,0207 mg/ml est observée, et en flavonoïdes (0,02326 mg/ml). En revanche, malgré la faible concentration des flavonoïdes dans cet extrait, mais il peut contenir d'autres types de flavonoïdes comme la catéchine et le flavonoïde 6 qui ne sont pas présents dans les autres extraits. La faible concentration globale peut être due à la solubilité limitée des composés dans le solvant d'éther de pétrole. Les résultats révèlent une différence significative de concentration entre les extraits. L'extrait brut se distingue par des concentrations élevées de polyphénols galliques, suggérant une richesse en composés bioactifs. En comparaison, les extraits EGDCM et EEPEG ont des concentrations moins élevées en polyphénols et en flavonoïdes.

En conclusion, l'extrait brut EBEG est la source la plus concentrée en polyphénols mais peu de flavonoïdes ont été décelés. Ces résultats soulignent l'importance de l'extrait brut comme une source potentielle de polyphénols, en particulier les acides gallique et éllagique, connus pour leurs propriétés antioxydantes et antibactériennes, bénéfiques pour la santé.

IV.4. La microencapsulation

IV.4.1. Réalisation des essais et analyse statistique

Le plan factoriel complet est le choix le plus adapté pour réaliser la microencapsulation des métabolites secondaires de l'extrait brut de *Punica Granatum*. Celle-ci a été réalisée suivant le procédé de simple émulsion (H/E) à température ambiante, en étudiant 3 facteurs à deux niveaux différents X1= dose (Acide gallique + Acide ellagique), X2= Rp (rapport massique mDex/mPEG), X3 (pH de la phase continue), et 2 réponses, Y1= EEP% (taux en polyphénols) et Y2=EEF% (taux en flavonoïdes). Un ensemble de 10 essais composant la matrice sont présentés dans le **Tableau IV.7**. L'évaluation statistique des données et la représentation graphique des résultats ont été réalisées par le logiciel MINITAB version 2017.

Tableau IV.7: Plan factoriel à 2 niveaux, 3 facteurs -2 réponses et taux d'encapsulation en polyphénols et en flavonoïdes des microparticules obtenues par simple émulsion H/E.

N° Essai	X1	X2	X3	EEP%	EEF%
1	-1	-1	-1	63.29	70.09
2	1	-1	-1	78.64	27.36
3	-1	1	-1	69.32	31.97
4	1	1	-1	88.34	78.24
5	-1	-1	1	92.60	52.54

6	1	-1	1	97.29	0
7	-1	1	1	55.06	13.77
8	1	1	1	39.51	0
9	0	0	0	63.31	0
10	0	0	0	59.40	0

Remarque : D'après les résultats des chromatogrammes par HPLC des filtrats des 10 essais de la microencapsulation (**Annexe III**), nous avons observé des pics de très faibles intensités de l'AG et de l'AE ainsi que des flavonoïdes. Ce qui permet de vérifier que les métabolites secondaires ont été microencapsulés efficacement dans la matrice Dex/PEG (Voir **Annexe III**).

IV.4.1.1. Utilisation de logiciel MINITAB

Le choix du logiciel s'est porté sur Minitab en raison de sa vaste gamme de fonctionnalité, de pouvoir de calcul des réponses dans divers domaines d'étude, l'analyse de données et la gestion de projets, l'automatisation. Il possède des outils pour les tests statistiques, l'analyse de la variance (ANOVA), et permet de tracer des courbes d'iso-réponses, construire des surfaces de réponse et déterminer les zones d'intérêt. Minitab permet aussi d'analyser l'effet des facteurs et leurs interactions, fournissant ainsi une compréhension approfondie sur les paramètres affectant l'efficacité de l'encapsulation.

Le plan d'expérience est réalisé à l'aide de Minitab après avoir défini les réponses, les facteurs et leurs niveaux. Le modèle mathématique présenté est un modèle quadratique incluant des interactions de deuxième et de troisième ordre avec chaque facteur :

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13} X_1 X_3 + a_{23} X_2 X_3 + a_{123} X_1 X_2 X_3 + e$$

Y : est le vecteur de réponse.

a_i : est l'effet (ou effet principal) du facteur **X_i**.

e : est le vecteur de l'écart.

a_i : (i=1, 2, 3) représente le coefficient des facteurs X (i=1, 2, 3). (i=1, 2, 3) représente l'effet du changement d'un facteur du niveau bas vers le niveau haut.

X_iX_j : représente l'effet de deux facteurs en même temps sur la réponse.

Y_i : taux des polyphénols (EEP%) et taux de flavonoïdes (EEF%) encapsulés, en fonction des facteurs étudiés.

IV.4.1.2. Taux d'encapsulation en polyphénols EEP%

a. Analyse de la variance et équation du modèle pour EEP %

L'analyse statistique permet d'évaluer les écarts de la valeur de la réponse donnée par le modèle, par rapport à la valeur expérimentale pour chaque terme de l'équation du modèle ainsi que son ajustement. Elle donne l'estimation de la probabilité p-value à un intervalle de confiance de 95%, que la valeur prédite ne s'écarte pas plus de 5% de la valeur expérimentale. Les erreurs et l'ajustement des valeurs sont soumis aux tests de Student (t) (écart de la droite de la valeur prédite en fonction de la valeur expérimentale par rapport à l'origine) et de Fischer F (écart du modèle par rapport à la linéarité, écart de la valeur ajustée par rapport à la valeur moyenne). Les paramètres du contrôle statistique ainsi que leurs valeurs sont présentés dans le **tableau IV.8**. L'équation du modèle linéarisé qui prédit le mieux la réponse EEP% en variables codées est :

- **Equation de régression en variables codées**

$$Y1(\text{EEP}\%) = 73,006 + 2,939 X_1 - 9,949 X_2 - 1,891 X_3 - 2,071 X_1X_2 - 5,654 X_1X_3 - 13,881 X_2X_3 - 2,989 X_1X_2X_3 - 11,65 \text{ Ct Pt}$$

Tableau IV.8 : Analyse statistique de la variance pour la réponse EEP%.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modèle	8	3009.74	376.22	49.22	0.110
Linéarité	3	889.53	296.51	38.79	0.117
X1=Dose	1	69.09	69.09	9.04	0,204
X2=Rp	1	791.82	791.82	103.59	0,062
X3=Ph	1	28.61	28.61	3.74	0,304
Way Interactions	3	1831.55	610.52	79.87	0,082
X1*X2=Dose*Rp	1	34.32	34.32	4.49	0,281
X1*X3= Dose*Ph	1	255.72	255.72	33.45	0,109
X2*X3=Rp*Ph	1	1541.51	1541.51	201.66	0,045
Way Interactions	1	71.46	71.46	9.35	0.201
X1*X2*X3=Dose*Rp*pH	1	71.46	71.46	9.35	0.201
Curvature	1	217.20	217.20	28.41	0.118
Erreur	1	7.64	7.64	/	/
Total	9	3017.39	/	/	/
Validation du Modèle		R² (%) = 99,75		R²ajusté (%) = 97,72	

- **Explication des résultats :**

Tous les termes de modèle la linéarité, les interactions à deux et à trois facteurs ne sont pas significatifs car leur p-value est supérieur à la probabilité au risque $\alpha = 0.05$ correspondant à l'intervalle de confiance de 95%, à l'exception d'une seule l'interaction $Rp*pH=X2*X3$ qui est significative avec une p-value de 0.045 qui est inférieure à la probabilité $\alpha = 0.05$.

Les coefficients de régression linéaire $R^2 = 99.75\%$ est supérieur au seuil minimal d'acceptation qui est de 98%, qui suggère que le modèle s'ajuste très bien aux données observées, en plus le R^2 ajusté = 97.72%

confirmant que le modèle reste très performant même après ajustement pour le nombre de variables permettent ainsi de valider l'équation du modèle et de prédire la réponse.

b. Diagramme de Pareto pour EEP% :

Le diagramme de Pareto pour la réponse EEP% (figure IV.9) nous clarifie et nous donne l'accès pour identifier et visualiser les causes les plus significatives, facilitant ainsi l'évaluation des principaux effets des paramètres ou des facteurs choisis et de leurs interactions dans l'ensemble des données étudiées, et de les classer par ordre d'importance.

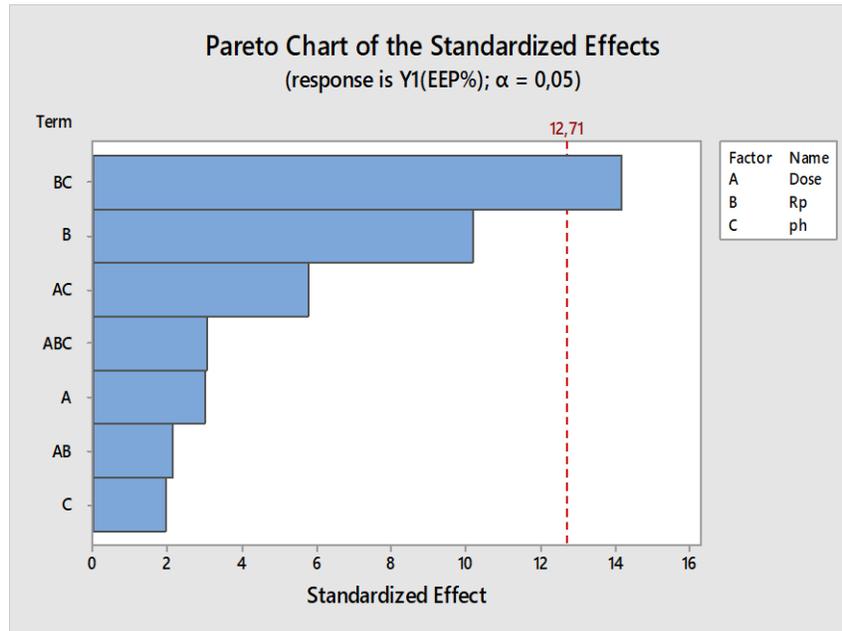


Figure IV.9 : Diagramme de Pareto des effets des termes sur EEP%.

- **Explication des résultats**

Le graphique de Pareto présenté dans la **Figure IV.9** illustre qu'une seule interaction, (Rp, pH), est significative, car la barre correspondante dépasse le seuil critique de 12,71. Par contre, les barres associées aux autres termes de l'équation se situent en dessous de ce seuil, d'où elles ne sont pas significatives. Malgré, ces termes ne sont pas significatifs mais ils ont aussi des effets sur la réponse EEP%.

Dans cette étude, le terme linéaire "B" (Rp) suit immédiatement l'interaction "BC", ce qui permet de le considérer comme un facteur influant le plus et d'une manière plus prévisible et significative sur la réponse Y (EEP%). Ensuite vient l'interaction "AC" (Dose, pH), suivie par l'interaction "ABC" (dose, Rp, pH) et "A" (dose), respectivement au même niveau tel qu'il semble être moins influant par rapport aux termes précédents. Finalement, les facteurs "AB" (dose, Rp) et le terme linéaire "C" (pH) présentent les influences les plus faibles sur la réponse.

c. Diagrammes des effets des facteurs sur la réponse EEP%

La figure IV.10 montre les effets des trois facteurs, dose, Rp et pH sur la réponse EEP%.

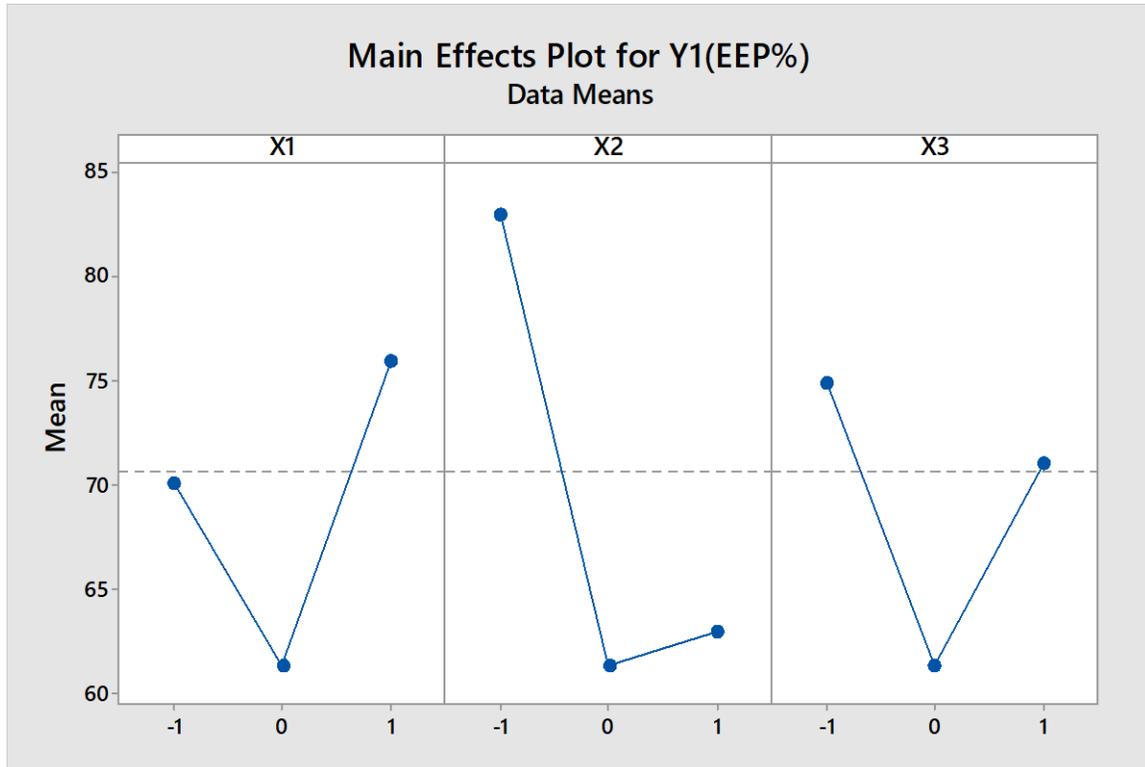


Figure IV.10 : Diagramme des effets des facteurs sur la réponse EEP%.

- **Explication des résultats**

Le taux de polyphénols encapsulés est presque moyen lorsque $X1 = -1$ (dose = 0.222) et ensuite minimal pour $X1 = 0$, correspondant à la dose moyenne de 0.444. Plus la dose s'approche de la valeur maximale de 0.666 ($X1 = 1$), plus le taux d'encapsulation augmente jusqu'à atteindre un maximum.

Le taux d'encapsulation avec le facteur $X2$ (Rp) est maximal (80%) lorsque $X2 = -1$ (Rp = 4), puis il diminue significativement pour la valeur moyenne de Rp ($X2 = 0$) jusqu'à 62%, pour ensuite augmenter légèrement à $X2 = 1$ (Rp = 12).

Le meilleur taux d'encapsulation (EEP%) est obtenu pour $X3$ (pH) à la valeur minimale ($X3 = -1$, pH = 4) avec 75% en EEP. Ensuite, il diminue significativement pour la valeur moyenne de pH (6), pour augmenter jusqu'à 70% à la valeur maximale de $X3$ (pH = 8).

En conclusion, le taux d'encapsulation (EEP%) est maximal lorsque $X1$ est maximal, $X2$ est minimal, ainsi que $X3$ ce qui implique que dose = 0.666, Rp = 4, et pH = 4.

d. Optimisation de résidus de la réponse EEP%

Les graphiques des résidus sont utilisés pour vérifier les hypothèses et la validité d'un modèle de régression, notamment en ce qui concerne la constance de la variance, la normalité, l'indépendance et la linéarité des résidus. La **Figure IV.11** contient quatre types de graphiques de résidus pour la réponse Y1 (EPP%).

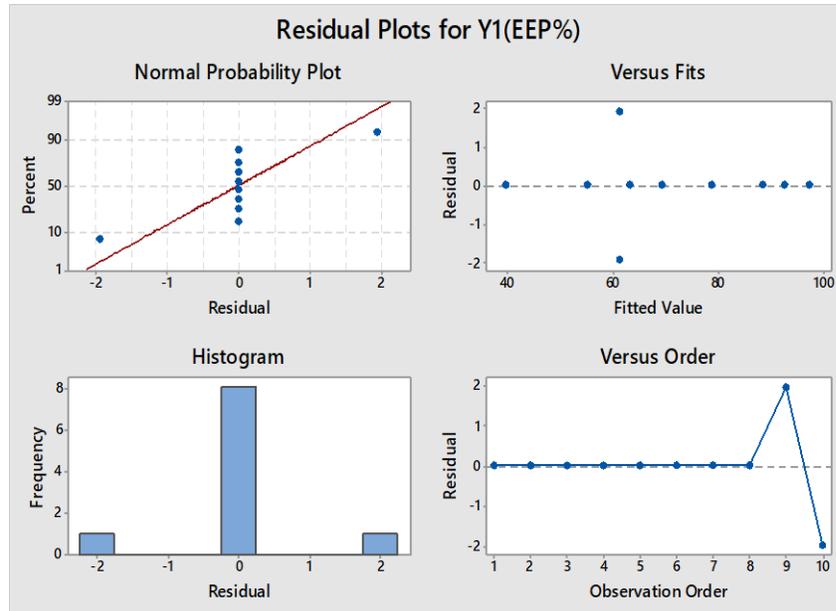


Figure IV.11 : Les graphes des résidus.

➤ Graphe de Normal Probabilité Plot :

Ce graphe vérifie si les résidus suivent une distribution normale le long de la ligne rouge (Normalité des Résidus), dans ce cas la majorité des points sont alignés dans le point 0 à l'exception de deux points situés dans -2, +2. A partir de ces résultats, on peut dire que les résidus sont pratiquement normaux, malgré les deux points déviants.

➤ Graphe de Versus Fits :

Ce graphe présente les résidus par rapport aux valeurs ajustées (Homoscédasticité). Les résidus devraient être distribués de manière aléatoire autour de zéro, dans ce graphe les résidus sont uniformément répartis autour de zéro, mais à part deux points en bas à gauche et en haut à droite. On peut dire que la variance des résidus est constante.

➤ Histogramme :

L'histogramme présenté dans la **Figure IV.11**. Illustre la distribution et l'indépendance des résidus. Pour un modèle validé ces résidus forment une distribution sous forme de cloche. Dans ce modèle, la plupart des résidus sont proches de zéro, à part de quelques résidus aux extrémités, donc on peut dire que c'est une distribution centrée mais avec des observations extrêmes qui s'écartent le plus des valeurs réelles.

➤ Graphique de Versus Order :

Se graphe représente la distribution des résidus en fonction de l'ordre des observations, il vérifie l'indépendance des résidus, dans ce graphe la majorité des résidus sont pré de zéro d'où les valeurs observés sont principalement indépendantes, mais dans les dernières observations un comportement anormal est observé dans les deux derniers résidus qui ont formé un pic, et signalent une aptitude d'autocorrélation.

- **Conclusion**

D'après les résultats présentés dans les graphes, le comportement des résidus semble être correct, à l'exception de quelques points anormaux. Le modèle de régression est donc adapté pour la plupart des données, mais une étude supplémentaire pourrait être requise pour les points extrêmes remarqués.

e. Diagrammes des surface-réponse RSM pour EEP%

La **Figure IV.12** illustre la représentation de la réponse Y1 (EEP%) et son optimisation par les diagrammes surface-réponse, sous l'influence de deux facteurs à la fois.

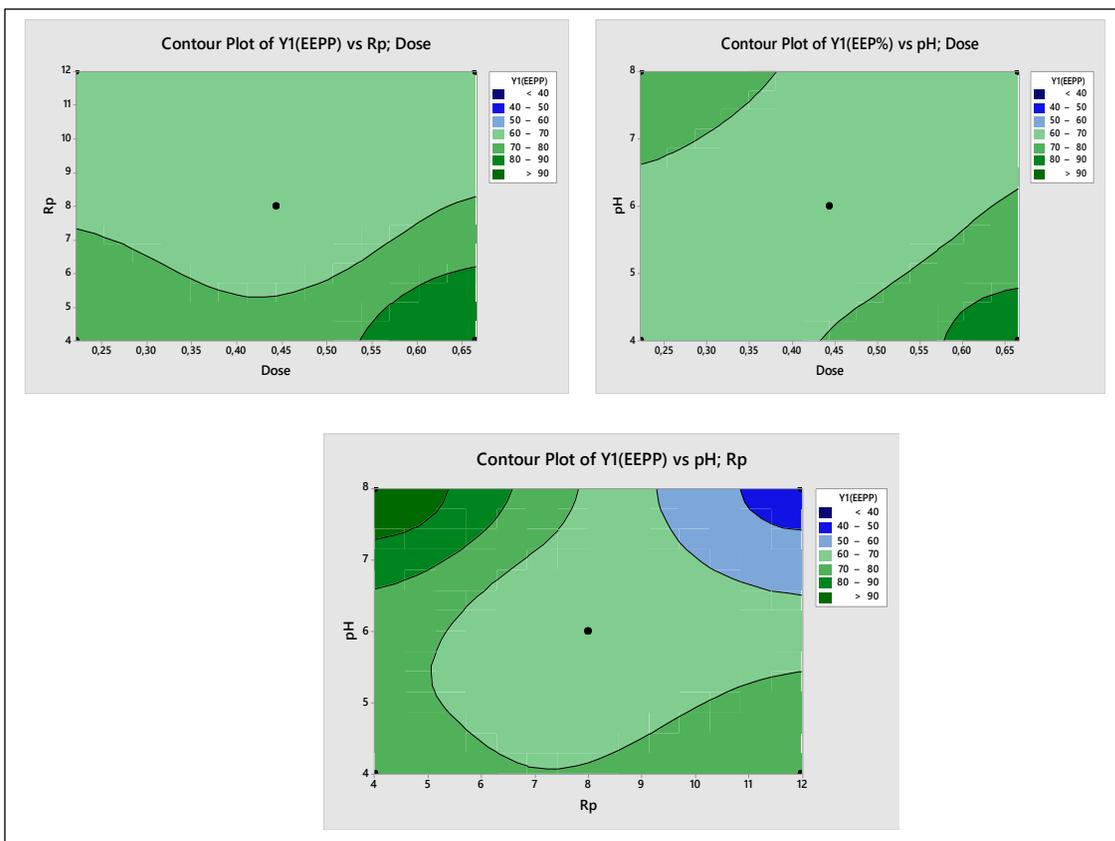


Figure IV.12 : Diagrammes Surfaces –Réponses ou contours pour EEP%.

- **Explication des diagrammes**

Le premier diagramme de contour (Dose, Rp) représente les domaines de la réponse EEP% en fonction des deux facteurs, Rp et dose. On observe un domaine où les taux d'encapsulation en polyphénols sont les plus élevés, compris dans un intervalle de [0.54 ; 0.66] pour la dose et de [4 ; 6] pour Rp. Ce qui signifie que plus la dose est maximale et la masse de PEG augmente, plus le taux d'encapsulation des polyphénols est optimal.

Pour le deuxième diagramme de contour (Dose, pH), la région où le taux d'encapsulation EEP% est le plus élevé (supérieur à 90 %), correspondant à des valeurs de dose dans un intervalle de [0.57 ; 0.66] et de pH entre [4 ; 5]. Ce qui montre que l'encapsulation des polyphénols est optimisée pour des doses maximales en extrait et en polyphénols et pour des pH légèrement acides et tendent vers des valeurs minimales.

Le troisième diagramme de contour qui est celui de l'interaction des facteurs pH et Rp. Il illustre une région verte très foncée qui représente un taux d'encapsulation de EEP supérieur à 90 %, pour un intervalle [4 ; 5.5] pour les valeurs de Rp et un pH compris entre [7.2 ; 8]. Ce qui montre que sous l'influence de l'interaction de ces deux facteurs, l'encapsulation est optimisée pour des rapports en polymères minimales correspondant à des masses en PEG maximales comprises entre 109 mg et 150 mg, et pour des pH légèrement basiques qui tendent vers la valeur maximale de 8.

D'après ces résultats, on conclut pour une dose maximale de (0.66 mg/ml), un pH élevé (8), ainsi que des valeurs minimales de Rp (4) correspondant à la masse maximale de 150 mg de PEG aident à favoriser et à augmenter le taux d'encapsulation des polyphénols.

f. Graph de Fitted line plot

Le graphique de la **Figure IV.13** présente le modèle de régression linéaire entre la valeur expérimentale Y_1 (EEP%) et la valeur prédite par le modèle $Y_{1\text{PRED}}$. L'équation de régression linéaire est donnée par $Y_{1\text{PRED}} = 0.179 + 0.9975Y_1$ (EEP%). Les statistiques de régression incluent l'erreur standard ($S = 0.476251$), le coefficient de détermination ($R\text{-Sq} = 99.7\%$), et le coefficient de détermination ajusté ($R\text{-Sq}(\text{adj}) = 99.7\%$). Le graphe illustre que les points sont tous alignés sur la ligne de régression, ce qui indique une bonne adéquation du modèle. De plus, les valeurs des statistiques indiquent que le modèle est bien ajusté, expliquant presque toute la variation des données, et les prédictions faites par ce modèle sont fiables.

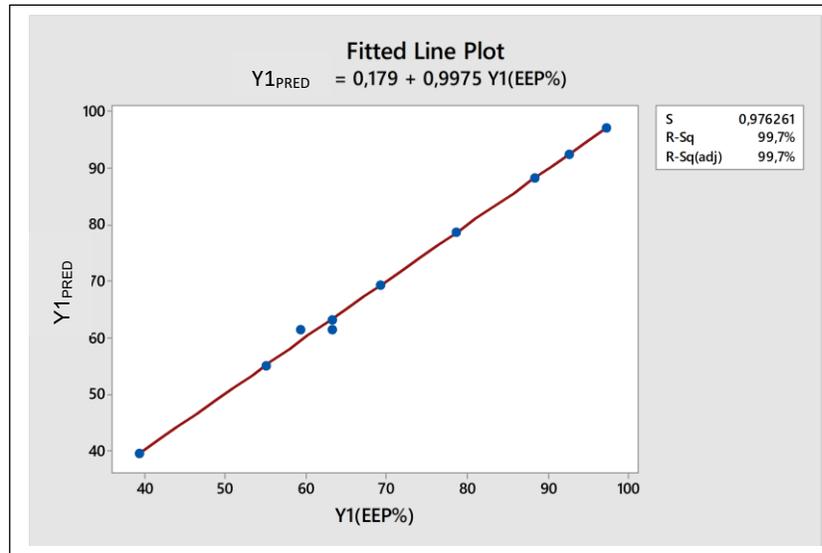


Figure IV.13 : La courbe valeur prédite du taux d'encapsulation EEP%.

IV.4.1.3. Taux d'encapsulation en flavonoïdes EEF%

a. Analyse de la variance et équation du modèle pour EEF %

Les paramètres du contrôle statistique ainsi que leurs valeurs sont présentés dans le **tableau IV.9**. L'équation du modèle linéarisé qui prédit le mieux la réponse EEF% en variables codées est :

Equation de régression en variables codées :

$$Y2(EEF\%) = 34,25 - 7,846 X1 - 3,251 X2 - 17,67 X3 + 15,97 X1X2 - 8,731 X1X3 - 6,441 X2X3 - 6,279 X1X2X3 - 34,25 \text{ Ct Pt} \dots\dots(2)$$

Tableau IV.9 : Analyse statistique de la variance pour la réponse EEF%.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modèle	8	8248.86	1031.11	/	/
Linéarité	3	3074.55	1024.85	/	/
X1	1	492.51	492.51	/	/
X2	1	84.57	84.57	/	/
X3	1	2497.48	2497.48	/	/
Way Interactions	3	2982.44	994.15	/	/
X1*X2	1	2040.65	2040.65	/	/
X1*X3	1	609.88	609.88	/	/
X2*X3	1	331.92	331.92	/	/
Way Interactions	1	315.38	315.38	/	/
X1*X2*X3	1	315.38	315.38	/	/
Curvature	1	1876.49	1876.49	/	/
Erreur	1	0.00	0.00	/	/

Total	9	8248.86	/	/	/
Validation du Modèle	R² (%) = 100			R²ajusté (%) = 100	

- **Explication des résultats :**

Tous les sources de variation testées (A, B, C, leurs interactions, et la courbure) ainsi que leurs p- value sont inférieures à la probabilité $\alpha = 0.05$. De ce fait, on peut dire que tous les termes ainsi que le modèle sont significatifs et très performants pour expliquer la variabilité de l'EEF% et prédire leurs valeurs. Les termes X3 (pH) et l'interaction X1.X2 (Dose. Rp) sont les plus significatifs, ce qui indique que ces facteurs contribuent énormément à l'efficacité du procédé de l'encapsulation des flavonoïdes par la dextrine et le PEG sous les conditions choisies du procès.

En conclusion, on peut dire que le modèle a une validité parfaite avec un R² qui indique que le modèle explique à 100% la variation dans la réponse Y2(EEF%), et un R² ajusté de 100% qui confirme la validité du modèle. Ce qui montre qu'il n'y a pas d'erreur résiduelle non expliquée.

- **b. Diagramme de Pareto pour EEF% :**

Le diagramme de Pareto de EEF% (Figure IV.14) met en évidence les principaux facteurs et leurs interactions qui influençant la réponse Y2 (EEF%), et de classer par ordre d'importance les facteurs les plus significatifs, dans le but d'améliorer l'encapsulation des flavonoïdes de l'extrait brut de *Punica Granatum*. Le diagramme montre que le terme C (pH) est le plus significatif d'où il a le plus grande influence sur la réponse Y2 (EEF%), suivi par l'interaction A.B (Dose. Rp), et l'interaction A.C (Dose et pH), viennent par la suite les termes les moins significatifs A (Dose), après les deux interactions A.B (dose. Rp) et A.B.C au même niveau d'influence. En revanche, le terme B (Rp) a le plus faible effet sur la réponse Y2(EEF%).

D'après les résultats présentés on conclut que l'équation du modèle est validée et le modèle est linéaire à 100%, et tous les termes influencent significativement sur le modèle.

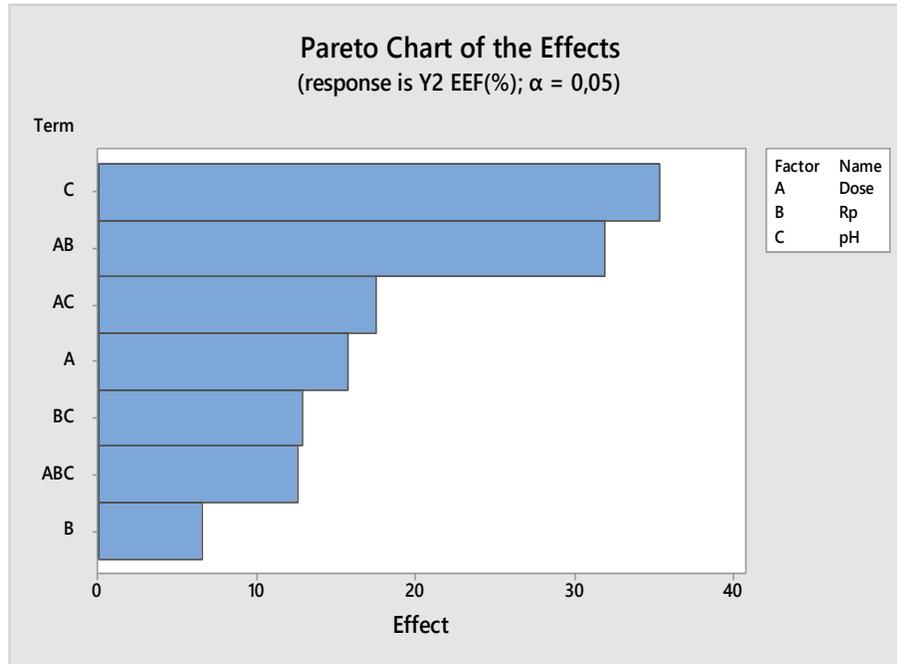


Figure IV. 14 : Diagramme de Pareto des effets pour EEF %.

c. Diagramme des effets des facteurs sur la réponse EEF%

La figure IV.15 montre l'influence des trois facteurs, X1(dose), X2(Rp), X3(pH) sur la réponse Y2 (EEF%).

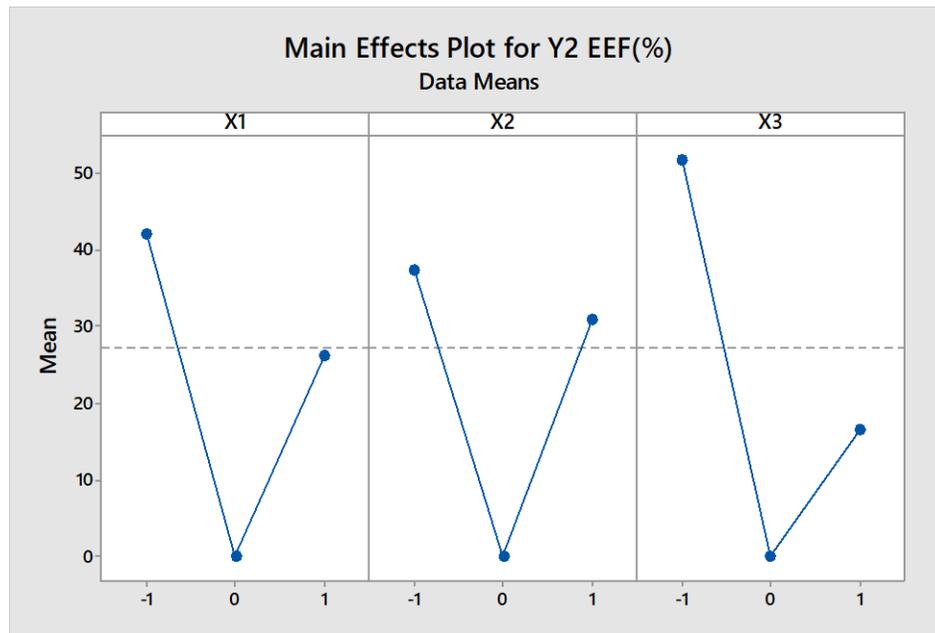


Figure IV.15 : Diagramme des effets des facteurs sur la réponse EEF%.

- Explication des résultats :

X1 (Dose) a un effet significatif sur la réponse Y2 EEF%. quand X1 est minimal (dose = 0.222052), le taux d'encapsulation s'élève significativement. Ensuite, il diminue de façon remarquable pour une dose maximale (X1 = 0.666156). Pour une dose moyenne (X1 = 0), aucun taux d'encapsulation n'est observé.

Pour X2 (Rp), on observe une tendance similaire à celle de la dose. Aux extrémités du graphique, le taux d'encapsulation est légèrement plus élevé pour une dose minimale que pour une dose maximale. En revanche, lorsque X2 = 0 (Rp = 8), aucune encapsulation n'est observée.

En ce qui concerne X3 (pH), on constate qu'il a le plus grand effet sur la réponse Y2 EEF%. Pour une valeur minimale de X3 (pH = 4), le taux d'encapsulation est élevé. Ensuite, pour une valeur maximale de X3, le taux d'encapsulation diminue significativement jusqu'à environ 15%. Pour une valeur moyenne de X3 (pH = 8), aucune encapsulation des flavonoïdes n'est observée.

En conclut, que pour améliorer la réponse Y2(EEF%) tous les facteurs doivent être minimales.

d. Optimisation de la réponse EEF% :

Les graphiques des résidus de la Figure IV.16 sont utilisés pour vérifier les hypothèses et la validité d'un modèle de régression, notamment en ce qui concerne la constance de la variance, la normalité, l'indépendance et la linéarité des résidus pour la réponse Y2 (EEF%).

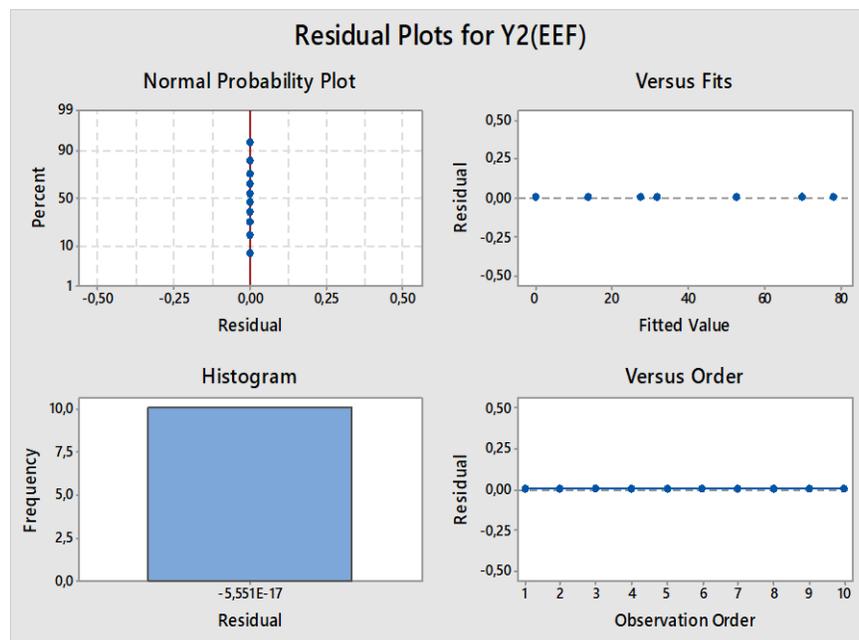


Figure IV.16 : Les graphes des résidus pour la réponse Y2 (EEF%).

➤ Graphe de Normal Probabilité Plot :

Ce graphe montre que toutes les pointes sont alignées dans le point 0, d'où on peut dire que les résidus ont distribué de façon normale.

➤ Graphe de Versus Fits :

Dans ce graphe les points sont bien répartis autour de la ligne horizontale à zéro. Cela indique la variance des résidus est constante il existe une homoscedasticité et une liaison linéaire est présentée entre les variables indépendantes et la variable dépendante, d'où le modèle est approprié.

➤ **Histogramme :**

L'histogramme montre, tous les résidus sont regroupés tous dans une valeur de résiduelle égale à $-5.551E-17$ qui est très loin de zéro, c'est une distribution symétrique centrée

➤ **Graphique de Versus Order :**

Se graphe représente distribution des résidus en fonction de l'ordre des observations, a pour vérifier l'indépendance des résidus, dans ce graphe tous les résidus semblent répartis d'une manière aléatoire, et qu'il n'y a pas de tendance ascendante ou descendante ce qui apporte l'indépendance des résidus ainsi on peut dire que notre modèle est fiable

• **Conclusion**

En peut conclure que les résultats de notre modèle de régression est fiable, et le comportement des résidus est correcte, et notre modèle décrit bien et explique la réponse expérimentale, qui est prédite avec une probabilité d'erreur nulle pour le taux d'encapsulation des flavonoïdes EEF% (Y2) de l'extrait brut des écorces de grenade.

e. Diagrammes des surface-réponse RSM pour EEF%

La figure IV.17 illustre la représentation de la réponse Y2 (EEF%) et son optimisation par les diagrammes surface-réponse, sous l'influence de deux facteurs à la fois.

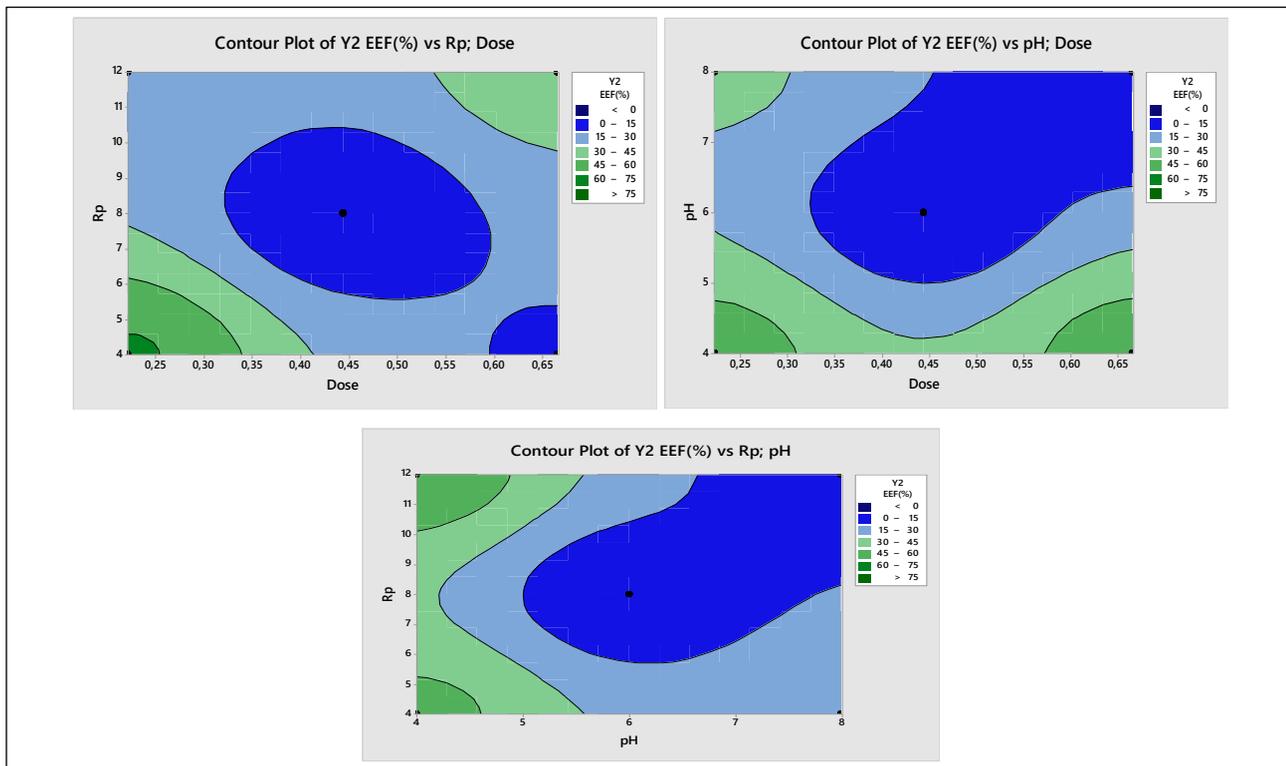


Figure IV.17 : Diagrammes Surfaces –Réponses ou contours pour EEF%.

- **Explication des résultats**

Le premier diagramme présente la relation entre la dose et Rp et les domaines de la réponse EEF%. La région la plus importante est celle de couleur vert foncé. On constate que le pourcentage le plus important (> 75%) correspond aux domaines compris dans un intervalle de Rp entre [4 ; 4.5] et de Dose entre [0 ; 0.26]. Par contre pour le deuxième diagramme (Dose et pH), on remarque qu'il n'existe aucune zone de réponse qui corresponde aux taux d'encapsulation le plus élevée (>70%), tandis que deux zones relatives aux taux d'encapsulation intermédiaires compris entre 60%-70% sont représentés sur le diagramme. La première zone est quand la Dose et le pH sont minimales et compris dans les intervalles [0 ; 0.31] et [4 ;4.7] respectivement, et la deuxième zone correspond au contraire aux valeurs maximales de la dose comprises dans l'intervalle [0.57 ;0.666], et aux pH minimaux dans l'intervalle [4 ;4.6]. Le troisième diagramme (Rp, pH) illustre une zone de réponse qui correspond aux taux d'encapsulation le plus élevée qui est dans l'intervalle Rp [4 ;5.1] et pH [4 ; 4.6].

On conclut que le taux d'encapsulation des flavonoïdes EEF% dépasse 70% uniquement lorsque Rp est minimal ou tend vers la valeur minimale, ce qui correspond à une masse maximale de PEG (150 mg), et la Dose ainsi que le pH tendent vers des valeurs minimales de leurs domaines de variation. Par contre, lorsque le pH dépasse 4 et la dose augmente les taux EEF% diminuent jusqu'à atteindre 0%.

f. Graph de Fitted Line Plot

Le graphe de la **Figure IV.18** montre une linéarité entre le pourcentage de taux d'encapsulation en flavonoïde (Y EEF%) et Y_{2PRED} , qui représente les valeurs ajustées ou prédites de modèle de régression. L'équation de la ligne ajustée est la suivante : $Y_{2PRED} = 0 + 1 * Y \text{ EEF } (\%)$. Les coefficients de régression R-Sq et R-Sq(adj) sont tous les deux égaux à 100%, et la valeur de l'erreur standard (S) est égale à 0.

On observe dans ce graphe que tous les points sont parfaitement alignés, donc il n'y a pas de variation résiduelle ou d'erreur, ce qui est peu commun dans des données réelles. Ce qui implique que chaque valeur de Y EEF% est exactement égale à la valeur prédite (Y_{2PRED}). Ainsi, toutes les variations dans la variable dépendante Y EEF% sont expliquées par le modèle.

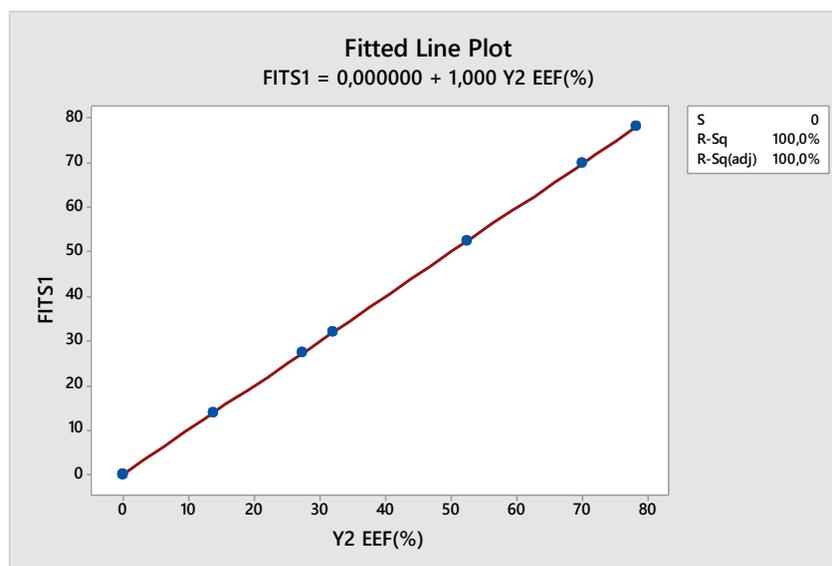


Figure IV.18 : La courbe valeur prédite du taux d'encapsulation EEF%.

IV.5. Etude de la cinétique de libération in vitro des principes actifs de l'extrait de *Punica Granatum* encapsulés dans les microparticules de PEG / Dextrine

Les cinétiques de libération des principes actifs (Polyphénols, Flavonoïdes), ont été réalisées sur des microsphères **EGM** (dextrine/ PEG) de l'extrait brut de *Punica Granatum* de l'essai 6 (relatif au meilleur taux d'encapsulation en polyphénols), sur la formulation pommade **PEGM** préparée avec la même masse en microsphères du même essai 6, ainsi que sur la formulation pommade **PEGEB** ne contenant que l'extrait brut EBEG avec la même dose en polyphénols que les microsphères. Celles-ci ont été effectuées dans un milieu physiologique tampon de pH=5.8, correspondant aux préparations pharmaceutiques destinées à la voie dermique.

IV.5.1. Profil de libération dans le milieu dermique :

Les taux de libération des polyphénols des substances étudiées (EGM6, PEGM6 et PEGEB) sont présentés dans le **Tableau IV.10**, pendant des intervalles de temps de 10mn, ou de 20 mn ou bien de 30 mn, à l'exception des flavonoïdes, car aucune libération des flavonoïdes n'a été observée pour tous les échantillons testés.

Tableau IV.10: Taux de libération des polyphénols des microsphères EGM6 de l'extrait brut de *Punica Granatum* dans Dextrine / PEG, des pommades PEGM6 et PEGEB dans le tampon à pH= 5.8 en fonction du temps.

Temps (min)	EGM6		PEGM6		PEBEG	
	Cp (mg/ml)	TLP%	Cp(mg/ml)	TLP%	Cp(mg/ml)	TLP%
10	0	0	4.611	62	0	0
20	3.315	22.3	0.665	8.95	0	0
30	12.239	82.36	2.559	34.4	3.957	8.89
40	0	0	1.465	19.73	0.484	1.10
50	0	0	1.274	17.14	0.09	0.202
60	1.05	7.06	0.958	12.89	0	0
80	3.441	23.15	0.676	9.09	0.1916	0.43
100	0	0	1.871	25.18	0	0
120	6.194	41.68	28.568	100	0	0
150	0	0	0.259	3.4	0	0
180	6.12	41.18	2.074	27.91	0	0
210	13.751	92.53	0	0	0	0
240	18.5	100	0	0	0	0

La **Figure IV.19** représente les courbes des taux de libérations des polyphénols (%) en fonction de temps (min), des trois formulations étudiées (EGM, PEGM et PEGEB) dans l'étude de la cinétique de libération dans le milieu physiologique dermique.

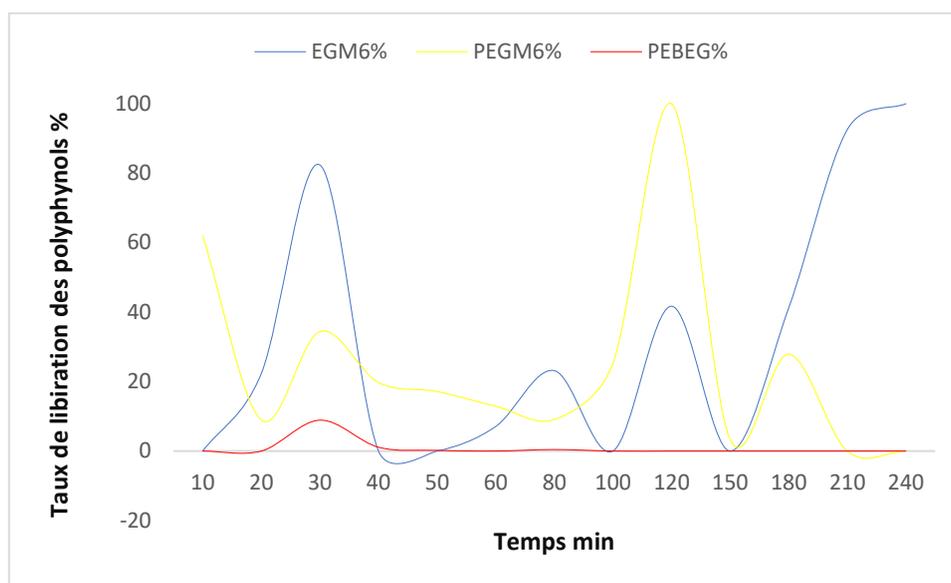


Figure IV.19 : Cinétiques de la libération des polyphénols.

- **Explication des résultats obtenus**

- **EGM6 :**

Les résultats montrent une variation de type polynomiale (selon le modèle de Peppas) des taux de libération des polyphénols au cours du temps à partir des microsphères de l'essai 6. Pour les deux premiers prélèvements, aucune libération n'est détectée. Mais, à partir du troisième prélèvement, une légère libération est observée, suivie d'une augmentation. Par la suite, le taux de libération diminue à zéro dans les deux prélèvements suivants. Ensuite, il augmente légèrement pour les deux essais suivants, avant de continuer à fluctuer jusqu'à la fin de la cinétique en atteignant 100% au bout de 4h. La fluctuation des taux de libération peut être attribuée au type de matrice des microsphères, constituée de dextrine et de PEG6000 qui permettent la diffusion des principes actifs (polyphénols) dans les deux sens opposés, soit des microsphères vers le milieu ou bien du milieu physiologique vers l'intérieur des microsphères à travers une matrice gonflante et poreuse. Ce qui permettrait la réabsorption de polyphénols libérés. On peut dire que les microsphères présentent une libération plus étendue dans le temps, ce qui pourrait les destiner à une formulation pour une action prolongée.

- **PEGM6 :**

L'analyse cinétique des taux de polyphénols de PEGM révèle une libération initiale significative au cours des dix premières minutes. Celle-ci est suivie par des fluctuations dans la concentration en polyphénols libérés tout au long de la durée de l'étude (4h), qui rappelle un profil de type polynomiale. Mais, on observe un pic de 100% à 120 minutes seulement, suivi d'une diminution progressive des taux de polyphénols jusqu'à

atteindre une valeur minimale (3.4%) d'abord au bout de 150 min, puis une légère augmentation exhibant un second pic à 180 min suivi d'une diminution jusqu'à 0% au bout de 4 heures. Ces observations suggèrent qu'au-delà de 2h, il se produit une réabsorption des principes actifs par la pommade qui ne se dissout pas dans le milieu.

➤ **PEBEG :**

L'allure de la courbe cinétique de cette formulation ne montre aucune libération des polyphénols dans les 20 premières minutes. Au-delà, on observe une libération intermittente et faible des polyphénols jusqu'à 60 minutes, qui s'annule par la suite. Ce qui indique que cette formulation est moins efficace pour une libération complète et rapide de la dose du principe actif, ou bien que les polyphénols sont dégradés au cours de temps dans le milieu physiologique à pH=5.8, du fait qu'ils ne sont pas protégés par une matrice polymérique des microsphères (dextrine/PEG).

- Pour les flavonoïdes aucune libération n'est observée pour les trois formulations durant toute l'étude de la cinétique de libération. Ces résultats sont probablement dus à un mécanisme de libération à effet retard, favorisé par la nature chimique des flavonoïdes qui sont moins solubles dans le milieu physiologique tampon pH=5.8.

Conclusion :

D'après ces résultats on peut conclure que la pommade des microsphères PEGM6 semblent être la meilleure préparation pour les applications dermiques à usage plus efficace et rapide, par rapport aux PEBEG. Et en ce qui concerne la formulation EGM6, elle se révèle avoir un effet prolongé, qui atteint 100 % en polyphénols libérés au bout de 240 minutes. Ce qui pourrait mieux la destiner pour l'administration par voie orale, en forme de comprimés ou de gélules pour une libération soutenue des composés actifs dans l'organisme.

IV. 6. Caractérisation par IRFT

Les spectres IR des microsphères des essais 4, 6 et 9 et d'extrait brut (EBEG), ont été enregistrés dans le domaine [4000-400 cm⁻¹]. L'analyse des spectres IR est faite par comparaison avec les spectres IR de références des standards, qui sont l'acide gallique, l'acide ellagique, la quercétine, TPP, la Dextrine et le PEG6000, afin d'identifier les différents composants existants dans l'extrait et dans les microparticules. Les spectres d'extrait et les microsphères sont présentés dans les figures suivantes et celle des standards sont présenté dans Annex VI.

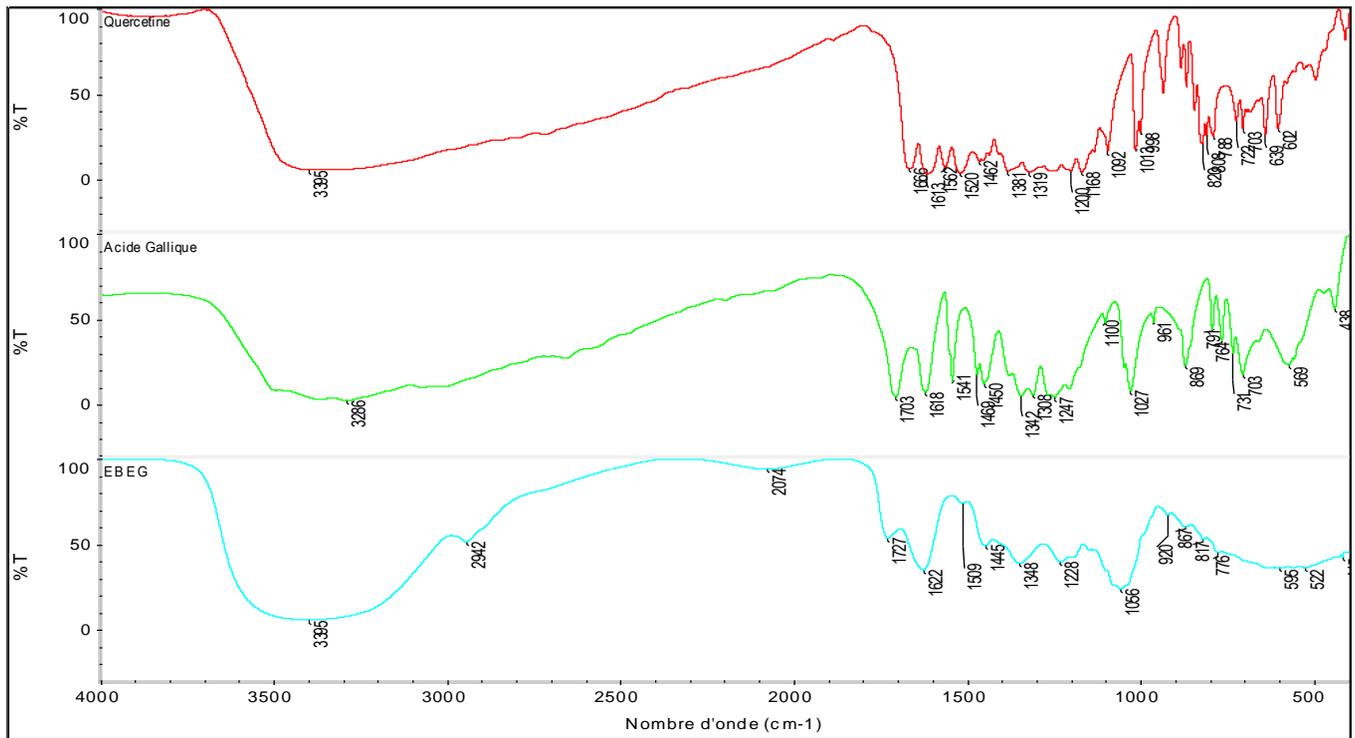


Figure IV.20 : Spectres IRFT de l'Acide gallique, de la Quercétine et de l'extrait brut de *Punica Granatum* (EBEG).

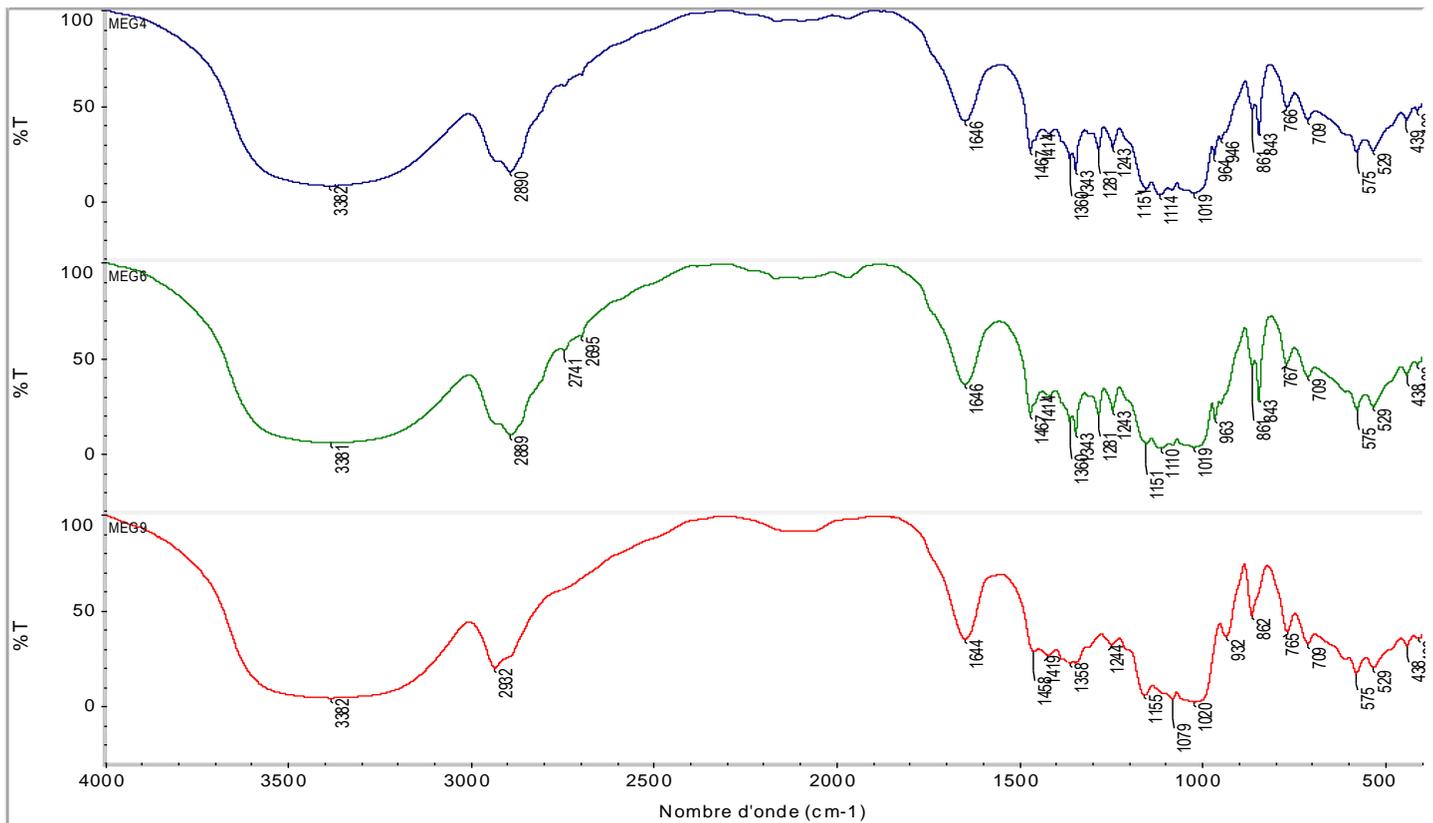


Figure IV.21 : Spectres IRFT des microsphères de l'extrait des trois essais MEG4, MEG6 et MEG9 en fonction du pH.

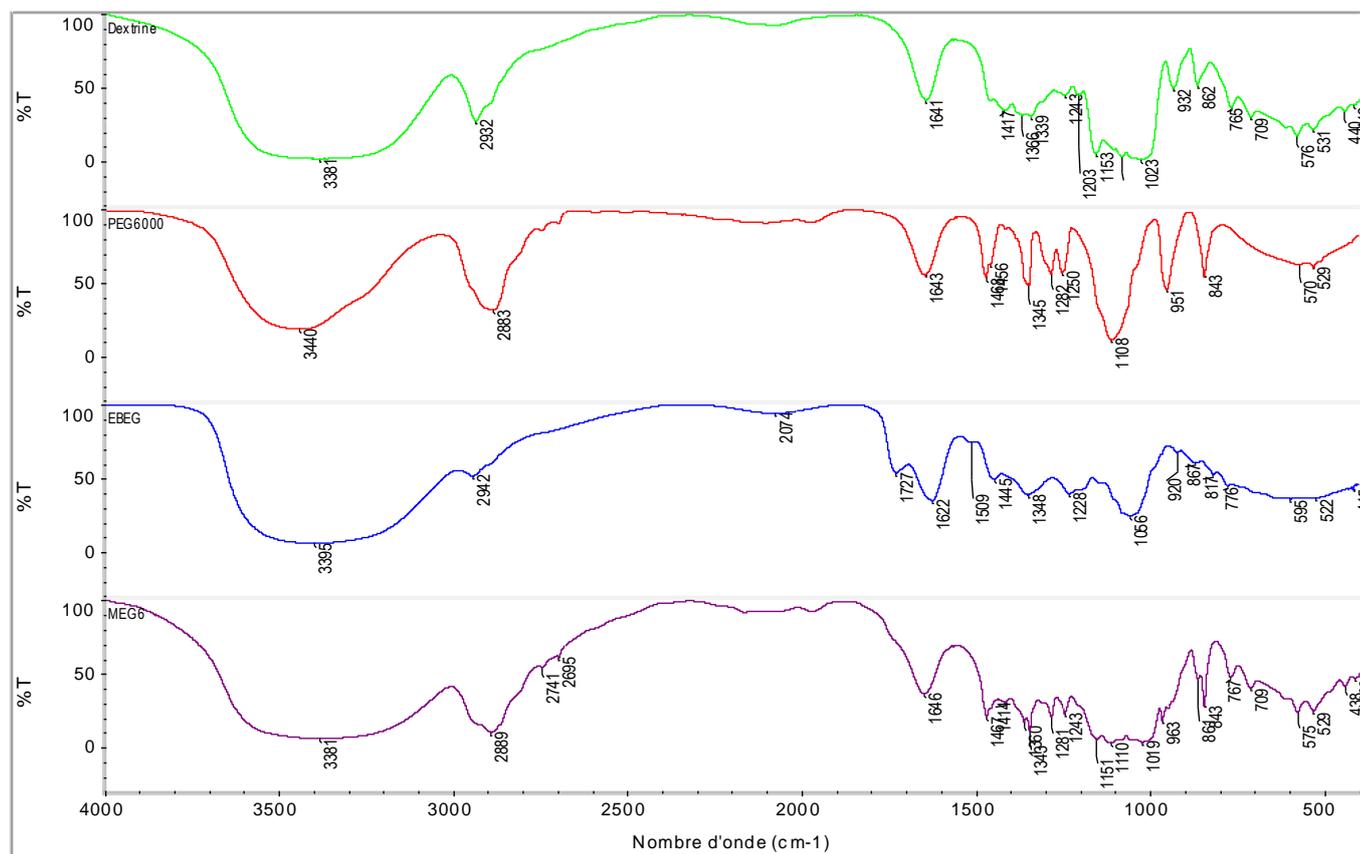


Figure IV. 22 : Spectres IRFT de la dextrine, du PEG, de l'extrait brut et des microsphères de l'extrait de l'essai 6 (EGM6).

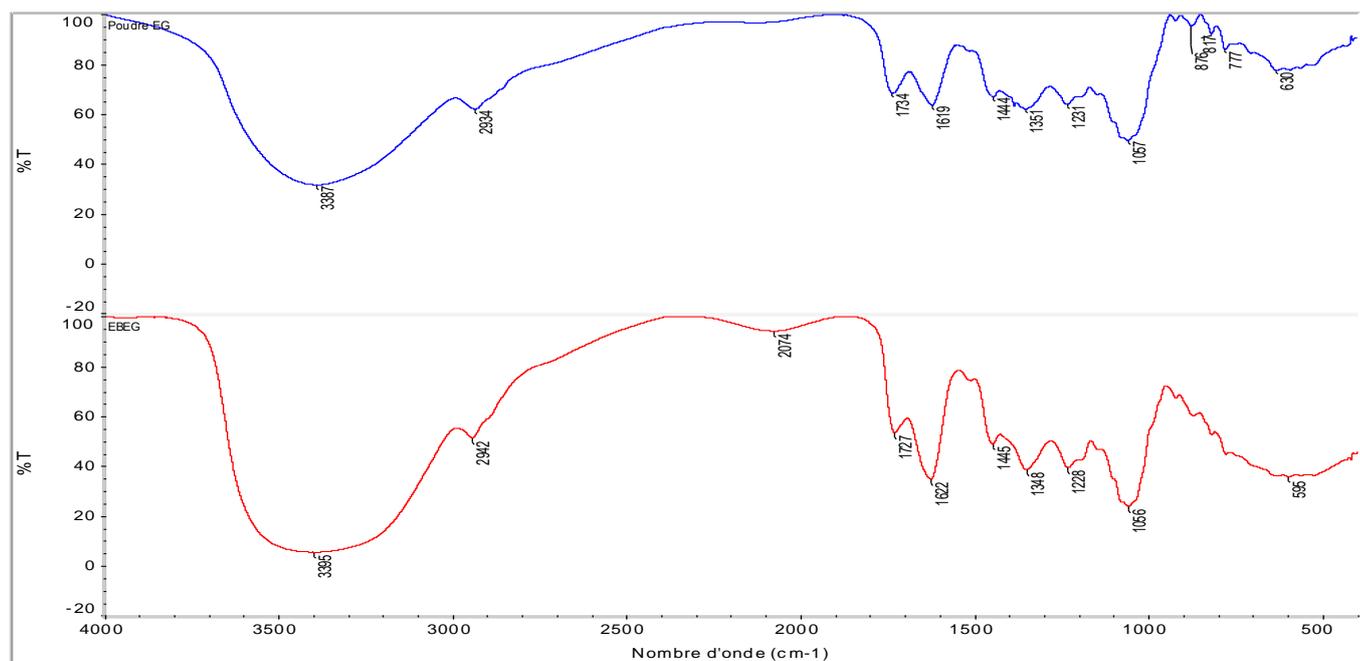


Figure IV. 23 : Spectres IRFT de la poudre de l'écorce et de l'extrait de Punica Granatum.

Nous avons résumé dans le **Tableau IV.11** les principales bandes d'absorption IR qui caractérisent les liaisons chimiques des composés présents dans l'extrait brut (EBEG) et dans les trois essais de la microencapsulation qui ont le meilleur taux d'encapsulation parmi les trois pH choisis (4,6,8), en le comparant à celles des standards (AG, Qr), et les excipients utilisés lors de la microencapsulation (TPPNa, PEG et dextrine).

D'après les résultats des analyses infrarouges, nous pouvons conclure que l'extrait est chargé en polyphénols (l'acide gallique et l'acide ellagique), ainsi qu'en flavonoïdes (la quercétine). Une bande caractéristique de l'acide gallique (AG) à environ 3382-3200 cm^{-1} dans MEG4 indique que l'intensité moyenne n'a pas été encapsulée, et une valeur de 1646 cm^{-1} dans MEG6 et de 3200 cm^{-1} dans MEG9 ainsi que ses trois essais (MEG4, MEG6, MEG9) ont enregistré des ondes importantes de dextrine et PEG et TPPNa qui ont été utilisés comme réactifs dans le procédé de la microencapsulation. D'après ces valeurs, nous concluons que presque tous les polyphénols et les flavonoïdes sont encapsulés, mais de manière plus prononcée pour MEG6, ce qui est attendu par rapport à nos résultats initiaux selon lesquels le taux d'encapsulation le plus élevé revient à MEG6.

Tableau IV.11 : Bandes d'absorption IR des liaisons chimiques caractéristiques de composés identifiés dans EBEG, MEG4, MEG6, MEG9 rapport aux standards et des réactifs de microencapsulation.

Nombres d'onde (cm-1)	Types de liaisons ou groupement chimique	Echantillon	Composés
3200-3400 1700-1740 1620-1450 1350-1000 950-600	OH (alcool) C=O (acide) C=C (aromatique) C-O (alcool) C-H (aromatique)	Acide gallique	Standard
3580-3600 3020-3400 1700-1740 1625-1680 1050-1450	OH(libre) OH(liées) C=O(ester) C=C(aromatique) C-O(ester)	Acide ellagique	Standard
3600-3250 1650-1730 1620-1450 1400-1100 1000	OH (alcool) C=O (cétone) C=C (aromatique) C-O (des alcools) C-O-C (cycle)	Quercétine	Standard
3500-3250 2800-3000 1650-1700 1400-1100 1000 950-600	OH (alcool) C-H C=C (alcène) C-O (des alcools) C-O-C (cycle) C-H (aromatique)	Dextrine	Polymère
3500-3250 2810-3000 1620-1450 1400-1100 950-600	OH (alcool) C-H (alcane) C=C (aromatique) C-O (des alcools) C-H (aromatique)	PEG	Polymère

3700-3125 3100-3000 1640-1600 1335-1165 1390-1315	O-H C-H C=C C-O O-H	TPPNa	Polymère
3600-3200	OH (alcool)	Acide gallique, acide ellagique	Extrait EG
920 -522	C-H (aromatique)		
1720-1680	C=O(ester)		
1300-1000	C-O		
1600-1500	C=C (alcène)	Ellagitannins et flavonoïdes	
1622-1450	C=C (aromatique)	Quercétine Acides gallique,acide ellagique.	
1300 -1000	C-O-C (cycle)		
3800-3000	OH (très large)	Quercétine Acides gallique,acide ellagique.	
1727-1622	C=O (acide)	/	
3600-3200	OH	Acide gallique et acides ellagique, Quercétine	
1750-1650	C=O		
1600-1400	C=C		
1400-1300	C-OH		
877-777	C-H (aromatique)		
1300-1000	C-O-C		
1300-1200	C-O	Ellagitannins et flavonoïdes	
3382- 3200	OH (alcool)	Acide gallique et acides ellagique Ellagitannins et flavonoïdes	MEG4
964-575	C-H	Dextrine, PEG	
2950-2890	Ctét-H	Dextrine	
1343-1114	C-O	TPPNa	
1646-1467	C=C (aromatique)	Acide gallique et acides ellagique Ellagitannins et flavonoïdes.	
3381-3250	O-H (liées)		
3000-2830	Ctét-H, C-H (alcane)	Dextrine, PEG	
3600-3381	OH(alcool)	Dextrine, TPPNa	
1341-1151	C-O	TPPNa	
3400-3200	O-H	Acide gallique et acides ellagique Ellagitannins et flavonoïdes .	MEG9
3020-2932	Ctét-H	Dextrine	
1644-1458	C=C	PEG	
3500-3382	O-H	Dextrine, PEG	
932-575	C-H (aromatique)		
1644-1600	C=C	TPPNa	
1244-1155	C-O		

IV.7. Résultats de l'activité antibactérienne :

Lors de cette étude, nous avons testé l'action d'extrait brute de punica granatum (EBEG) et les microsphères de l'essai 6 de la micro encapsulation, aussi les deux pommade formulé (pommade des microsphères de l'essai 6, pommade de l'extrait brute) sur deux souche bactérienne différent (Staphylococcus aureus, Escherichia coli) en utilisant la méthode des disques et la méthode des puits selon le même mode opératoire décrit préalablement.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des puits et des disques Imprégnés par des substance testé (EBEG, microsphère de l'essai 6, PEGM6, PEGEB) ont été mesurées. Les résultats obtenus de EBEG et microsphère sont présentés sur **Figure IV.24**. Et **Figure IV.25**. Pour les résultats de la pommade sont représenté dans la **Figure IV.27**. Et **Figure IV.28**.



Figure IV.24 : Zones d'inhibition des microsphères par la méthode des puits, EBEG par la méthode des puits et des disques respectivement sur la bactérie Staphylococcus aureus.

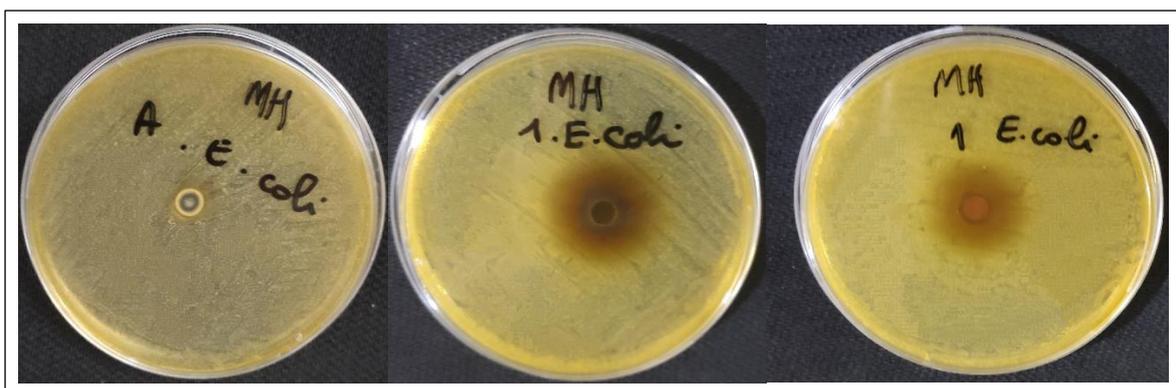


Figure IV.25 : Zones d'inhibition des microsphères par la méthode des puits, EBEG par la méthode des puits et des disques respectivement contre la bactérie Escherichia coli.



Figure IV.26 : Témoin de bactérie *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* respectivement.

A : alcool. E : eau stérile.

Les Figures IV.24 et IV.25 révèlent que l'extrait brut de l'écorce de *Punica Granatum* (EBEG) présente une très bonne activité contre les souches de *Staphylococcus aureus* surpassant celles des microsphères. Mais l'activité antibactérienne est plus importante que celle du témoin. En revanche les deux substances testé (EBEG, microsphères) montrent une activité relativement faible contre *Escherichia coli*.



Figure IV.27: Zones d'inhibition de pommade de EBEG et pommade de microsphère contre la bactérie *Staphylococcus aureus* par la méthode des disques et des puits.



Figure IV.28: Zones d'inhibition de pommade de EBEG et pommade de microsphère contre la bactérie *Escherichia coli* par la méthode des disques et des puits.

P : méthode des puits. D : Méthode des disques. SA : *Staphylococcus aureus*.

EC : Escherichia coli. H : pommade à base de EBEG. C : Pommade à base des microsphères.



Figure IV.29 : Témoin de bactérie Escherichia coli et Staphylococcus aureus respectivement.
AT : antibiotique. A : Alcool. P : Pommade témoin

On remarque que dans les **Figure IV.27**, **Figure IV.28** la zone d'inhibition la plus grande est celle de la pommade de microsphères dans les deux méthodes (disque et puits) contre la bactérie *Staphylococcus aureus*, en comparaison, la pommade témoin montre aussi une activité notable également l'alcool comme attendu à une activité, bien que l'antibiotique utilisé soit le plus efficace. Concernant Escherichia coli, aucune activité n'est observée pour les deux méthodes testées, à l'exception du témoin alcoolique qui a une activité antibactérienne comme été attendu. Les diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne sont présentés dans le **Tableau IV.12**.

Tableau IV.12: Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes formulations et extrait brut testés vis-à-vis des souches bactériennes.

Formulation	Méthode	Essais	Escherichia coli (Diamètre mm)	Staphylococcus aureus (Diamètre mm)
EBEG	Disques	1	10	20 (+++)
		2	9	20 (+++)
		3	10	17 (++)
	Puits	1	11	28 (+++)
		2	11	27 (+++)
		3	11	27 (+++)
EGM6	Disques	1	/	0 (-)
		2	/	0 (-)
		3	/	0 (-)
	Puits	1	/	12 (+)
		2	/	10 (+)
		3	/	9 (+)
PEGEB	Disques	1	/	9 (+)
		2	/	10 (+)
		3	/	10 (+)
	Puits	1	/	14 (+)
		2	/	15 (++)
		3	/	16 (++)
PEGM6	Disques	1	/	14 (+)
		2	/	11 (+)

		3	/	12 (+)
	Puits	1	/	19 (++)
		2	/	19 (++)
		3	/	19 (++)

Le **Tableau IV.12** regroupe les valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes formulations testées par rapport à l'extrait brut (EBEG, EGM6, PEGM6, PEGEB). L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Moreira et al., 2005**. Ils ont classé le diamètre des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne comme suit :

- ✓ Non sensible (-) : $D \leq 8$ mm
- ✓ Sensible (+) : $9 \leq D \leq 14$ mm
- ✓ Très sensible (++) : $15 \leq D \leq 19$ mm
- ✓ Extrêmement sensible (+++) : $D \geq 20$ mm [1].

➤ ***Staphylococcus aureus* :**

L'extrait brut de *Punica granatum* (EBEG) montre des diamètres d'inhibition compris entre 17 mm et 20 mm par la méthode des disques et entre 27 mm et 28 mm par la méthode des puits. Les diamètres des zones d'inhibition des microsphères par la méthode des puits varient de 9 mm à 12 mm, tandis que pour la méthode des disques ne fait apparaître aucune zone d'inhibition.

La pommade à base d'extrait EBEG présente des diamètres de 9 mm et 10 mm par la méthode des disques, et de 14 mm, 15 mm, et 16 mm par la méthode des puits. La pommade à base de microsphères, présente des diamètres de la zone d'inhibition de 11 mm, 12 mm et 14 mm par la méthode des disques, et de 19 mm par la méthode des puits.

➤ ***Escherichia coli***

Elle se révèle très sensible uniquement à l'extrait brut (EBEG), avec des valeurs comprises entre 9 mm et 10 mm par la méthode des disques et de 11 mm pour les trois essais de la méthode des puits. Aucune sensibilité n'a été détectée pour les formulations testées.

a. Explication des résultats :

Pour la souche bactérienne de *Staphylococcus aureus*, la méthode des disques et la méthode des puits se sont révélées presque efficaces pour toutes les substances testées, avec des variations dans les diamètres des zones d'inhibition. L'EBEG est le plus efficace parmi toutes les substances testées, après la pommade à base de microsphères (qui est la plus efficace selon la méthode des puits et après celle des disques). Cette efficacité élevée peut être expliquée par le fait que les polyphénols des microcapsules diffusent bien à travers les polymères utilisés dans la microencapsulation, la pommade à base d'EBEG a montré un pouvoir d'inhibition moyen, ce qui peut être dû à une mauvaise diffusion des polyphénols dans les excipients de la pommade, ou bien ceux-ci subissent une dégradation au cours du temps. Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les microsphères selon la méthode des

disques, ce qui peut être dû au fait que l'huile de l'extrait brut ne se diffuse pas à travers le disque. Les résultats des tests microbiologiques ont montré que la bactérie *Escherichia coli* est plus résistante et moins sensible par rapport aux *Staphylococcus aureus*.

L'activité antibactérienne est liée aux plusieurs facteurs, le type de bactérie gram (-) ou (+) car les gram (-) ont révélé d'être plus résistante par rapport aux autres, aussi les changements environnementaux externes, le type de substance testée et son pouvoir antibactérien. A la lumière de ces résultats, on dit que l'extrait brut de punica granatum contient un agent antibactérien et la pommade des microsphères formulée est prouvée très active contre les souches de bactéries *Staphylococcus aureus*.

IV.8. Observations microscopiques :

Dans cette section nous présentons les résultats de l'analyse morphologique des microsphères des essais 4, 6 et 9 avec le microscope optique polarisant avec différents grossissements (Figures IV.30, 31 et 32).

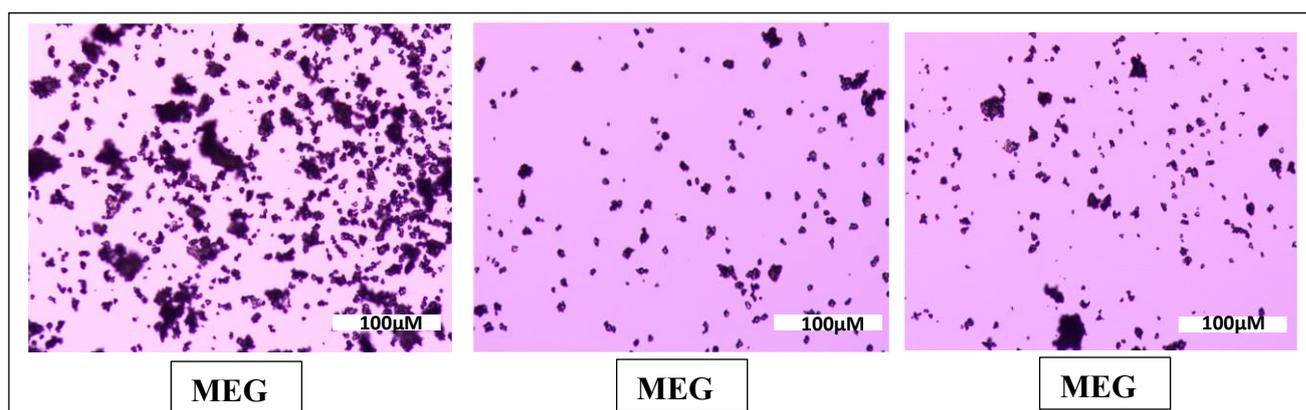


Figure IV.30 : Images des microsphères MEG4, MEG6 et MEG9 avec un grossissement x100.

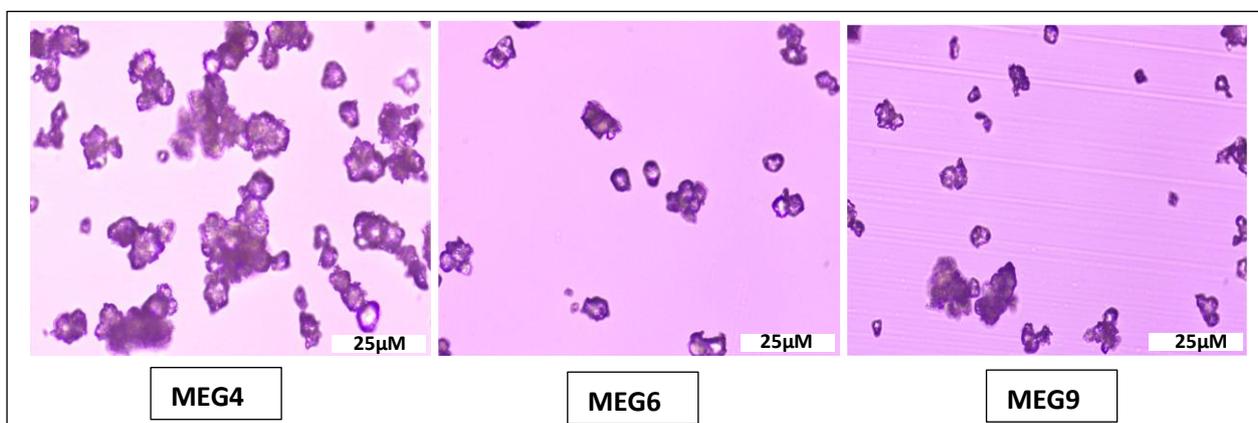


Figure IV.31 : Images des microsphères MEG4, ME6 et MEG9 avec un grossissement x400.

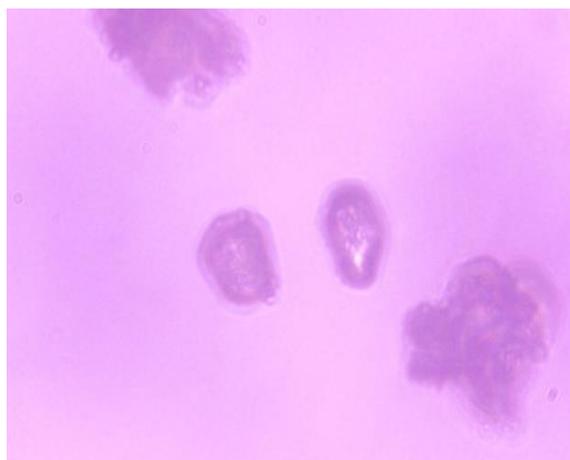


Figure IV.32 : Image des microsphères MEG6 avec un grossissement x1000.

Pour les microsphères de l'essai 6, nous avons opté pour le grossissement maximal possible de 1000 fois, car cet essai a présenté le taux d'encapsulation le plus élevé. Nous avons donc concentré notre attention sur cet essai, en commençant par des grossissements de 100 et 400 fois pour obtenir une image claire des microsphères. On remarque qu'avec un grossissement de 100 fois, les microsphères de MEG4 apparaissent comme des particules de dimensions de taille plus importante que celles des microsphères MEG9 et MEG6. Ces dernières sont de distribution de tailles plus uniforme et de plus faibles dimensions. Avec un grossissement de 400 fois, on constate la présence des points brillants plus clairs à l'intérieur des microsphères. Ce qui montre que les microcapsules ont encapsulé avec succès les métabolites secondaires de l'extrait d'écorce de grenade. On peut conclure aussi que les microparticules obtenues sont du type réservoir. Pour le grossissement de 1000 de MEG6, on observe clairement deux microsphères de même taille d'environ une dizaine de microns, de forme ovoïde, ce qui confirme que les microsphères de l'essai 6 à pH 8 exhibent les particules les plus petites, les plus sphériques et les plus homogènes comparées aux microsphères de l'essai 4 à pH 4 et celles de l'essai 9 à pH 6.

Conclusion et
perspectives



Conclusion

L'exploitation des plantes médicinales dans l'industrie pharmaceutique est une pratique ancienne, qui est développée et continue de s'améliorer grâce aux avancées technologiques et scientifiques, pouvant garantir leur durabilité, sécurité et leur efficacité. Vu qu'elles sont une source riche de composés bioactifs, elles peuvent être utilisées comme un modèle pour la synthèse de nouveaux médicaments, ou bien exploitées directement comme un médicament, en raison de leur gamme étendue des activités biologiques contre les microorganismes, telles que l'activité antioxydante et antibactérienne vis-à-vis des virus et du stress oxydatif des radicaux libres, souvent cancérigènes.

Dans le cadre de notre travail sur l'écorce de fruit de *Punica Granatum L*, nous avons identifié et caractérisé les métabolites secondaires présents dans les extraits de cette écorce, notamment les polyphénols totaux (acide gallique, acide ellagique), les flavonoïdes (quercétine), grâce à des techniques d'analyse (UV visible, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier), et ainsi nous avons évalué l'activité antioxydante et anti bactérienne de ces extraits. Ces derniers ont fait l'objet de formulation pharmaceutique par microencapsulation et de préparation d'une pommade dermique anti-bactérienne. A la lumière de nos résultats on peut conclure que :

- Les rendements des extraits d'écorce de grenade (EBEG, EGDCM, EEPEG et EEGA) ont montré une rentabilité importante en extraits polaires spécialement pour EBEG à 40.56% suivi par EEGA à 16.11%, alors qu'il diminue en passant à l'extrait apolaire EEPEG et faiblement polaire EGDCM (0.4944%, 4.9878% respectivement). Ces rendements dépendent de la polarité des solvants utilisés lors de l'extraction.
- L'analyse quantitative des extraits grâce à des techniques d'analyse UV-visible et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), a abouti à des teneurs importantes en acide gallique, acide ellagique et autres polyphénols, et moins en quercétine et flavonoïdes. Ces teneurs varient d'un extrait à l'autre, et on a trouvé que l'extrait brut (EBEG) est le plus riche en ces composés bioactifs, suivie par les extraits dans les solvants moins polaires et apolaires, due à la nature chimique et à l'affinité des polyphénols qui sont très solubles dans les solvants polaires.



Conclusion et Perspective

- L'activité antioxydante est très importante et correspond à de grands pourcentages d'inhibition du radical DPPH°, pour tous les extraits pour une faible quantité de DPPH. A une quantité plus élevée en DPPH, le pourcentage d'inhibition décroît pour tous les extraits. En particulier, l'extrait EGDCM a montré une activité antioxydante la plus stable et efficace, ce qui indique que la teneur en polyphénols n'est pas le seul facteur déterminant l'activité antioxydante. Les extraits peuvent contenir d'autres composés bioactifs ou montré des synergies entre les métabolites, contribuant de manière significative à leur efficacité antioxydante.
- Le procédé de micro-encapsulation de l'EBEG vise à optimiser la formulation des microsphères contenant le principe actif EBEG par simple émulsion. Le meilleur taux d'encapsulation des polyphénols atteint 97,29 %, avec une dose maximale de 0,666 mg/ml, un rapport de polymères minimal Dex/PEG= 4 et un pH de 8. Contrairement à ceci, les flavonoïdes ont présenté un taux d'encapsulation le plus élevé de 78,24 % pour un pH minimal de 4, un Rp maximal de 12 et une dose maximale de 0.666 mg/ml.
- Les résultats de notre étude de modélisation des taux de polyphénols (EEP%) et des flavonoïdes (EEF%) ont abouti à un modèle globalement bien ajusté, qui nous donne un soutien fiable pour maximiser les rendements des composés bioactifs, tout en optimisant les conditions physico-chimiques pour l'amélioration continue des techniques d'extraction et d'encapsulation.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait EBEG et des microsphères contenant une dose de l'extrait de l'essai 6 (MEG6) visait à développer une pommade dermique cicatrisante contre les souches bactériennes *E. coli* et *S. aureus*. Les résultats ont montré que les bactéries à Gram positif (*S. aureus*) sont plus sensibles que celles à Gram négatif (*E. coli*) aux métabolites secondaires testés. Bien que la préparation pommade des microsphères de l'essai 6 (PMEG) soit prometteuse contre la souche *S. aureus*, il s'avère que la pommade préparée à partir de l'extrait ne soit assez efficace vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. D'où la nécessité d'améliorer cette formulation en augmentant la dose en polyphénols.
- Une étude de la cinétique de libération des deux pommades et des microsphères MEG6 a fourni des résultats sur le mode d'action de ces substances. Les profils cinétiques observés montrent que la libération des polyphénols de la pommade à base de microsphères présente un effet retard. En revanche, la pommade contenant l'extrait brut n'a montré aucune



Conclusion et Perspective

libération. Quant aux microsphères, elles présentent une cinétique de libération à effet prolongé. Ce qui pourrait les prédestiner à une administration par voie orale.

- Nous avons également caractériser par infrarouge l'extrait et les microsphères et réussi à identifier dans notre extrait ainsi que dans les microcapsules des essais à différents pH, MEG4 (pH=4), MEG6(pH=8) et MEG9 (pH=6), certains principes actifs comme l'acide gallique et la quercétine. De plus, des observations microscopiques optiques des microparticules MEG4, MEG6 et MEG9, ont montrés un certain aspect morphologique qui rappelle celui des microcapsules de systèmes réservoir, et nous a permis d'affirmer que les microcapsules de l'extrait MEG6 présentent une taille et une structure la plus organisée et la plus homogène en termes de distribution de dimensions, qui de l'ordre d'une dizaine de micron.



Perspectives

Ce travail suggère une suite très intéressante, qui implique la réalisation d'autres expériences et applications comme :

- Faire des tests in vivo précliniques pour affirmer le pouvoir anti-bactérien et cicatrisant des pommades.
- Préparer une forme pharmaceutique pour la voie orale à partir des microsphères, comme les comprimés et les gélules.
- Tester d'autres souches anti-bactérienne, telles que les *Salmonella*.
- Explorer l'influence d'autres paramètres dans le plan d'expérience, comme le temps, la température et le taux de surfactant (TPPNa).

Références
bibliographiques



Référence Bibliographique

- [1]. Serquén L. M., Mantilla, M. C. M., & Osore, S. A. I. (2020). Susceptibilidad de "candida albicans" a extracto etanólico de cáscara de "punica granatum". *Medicina naturista*, 14(1), 59-64.
- [2]. Sofowora A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Paris, 384p.
- [3]. Harrar A. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas, Sétif.
- [4]. Enneb H. Belkadhi A. Cheour F. Ferchichi A. 2015. Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of new sciences*, 20(2).
- [5]. Lansky E. et Newman R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.109: 177–206.
- [6]. Jiofack T. Fokunang C. Guedje N. Kemeuze V. Fongnzossie E. Nkongmeneck BA. Mapongmetsem PM. Tsabang N. 2010. Ethnobotanical uses of medicinals plants of two ethnoecological regions of Cameroon. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 2 (3) : 60-79.
- [7]. Benoit Bock. (2013). Tela Botanica : Base de données Nomenclature de la flore en France. BDNFF. 4p.
- [8]. Ilham Hamid. (2014). Contribution à la Valorisation alimentaire de la grenade Marocaine (*Punica Granatum* L) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Université d'Alger.
- [9]. https://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=grenade_nu
- [10]. Amouretti M.C. Comet G. - Cahier d'histoire des techniques - Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'université de Provence. 1992. 174 pages. Page 81.



Référence Bibliographique

- [11]. <https://www.kew.org/plants/pomegranate>.
- [12]. Quiroz I. (2009). Granados. perspectivas y oportunidades d'un negocio emergente : Antecedentes de Mercado. Fundacion Chile.72p.
- [13]. D.S.A. (JUILLET 2021). Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information. Série B 2019 .Page75.
- [14]. Stover E. et Mercure E. W. (2007). The Pomegranate: A New Look at the Fruit of Paradise HortScience, 42.
- [15]. Bouras H. (2019). Biodiversité et Multiplication *in vitro* de grenadier *Punica granatum* L. mémoire fin de cycle. Université MOHAMED BOUDIAF - M'SILA.
- [16]. INRA. (2006). Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétique pour L'alimentation et l'agriculture.
- [17]. Anonyme. (2010). Plants profile : *Punica granatum*. Natural Resource Conservation Service, United States Department of Agriculture. www.plants.usda.gov. Date de consultation : juin 2010.
- [18]. Evreinoff V. (1957). Contribution à l'étude du Grenadier - Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée. Pp 124-138.
- [19]. Godet J. (1991). Arbres et arbustes aux quatre saisons - Les guides pratiques du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé. Pp 96 - 170.
- [20]. https://www.bio-provence.org/IMG/pdf/fiche_technique_grenade_finale_bd.pdf
- [21]. Cazin F. J. Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées. Editions de l'envol. 1868. 1189 pages. Pages 497-501.
- [22]. Bärtels A. Guide des plantes du bassin méditerranéen. Editions Ulmer. 1998. 400 pages. Page 352.
- [23]. Courchet l.d.j. - Traité de botanique : comprenant l'anatomie et la physiologie végétales et les familles naturelles, à l'usage des candidats au certificat d'études physiques, chimiques et naturelles des étudiants en médecine et en pharmacie. Editions Baillière. 1897. 1320 pages. Pages 1019-1023.



Référence Bibliographique

[24]. https://www.dieti-natura.com/media/wysiwyg/fiches-plantes/grenade/illustration_grenade.jpg

[25]. Guibourt N.B. (2014). Histoire naturelle des drogues simples, Cambridge University Press.

[26]. Planchon G. (1875). Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale, F. Savy.

[27]. Guibourt N.B. (2014). Histoire naturelle des drogues simples, Cambridge University Press.

[28]. Lansky E.P. Newman R.A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer, Journal of Ethnopharmacology. 109, 177–206.

[29]. Melgarejo. Salazar D. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. Food Res. 60 : 185-190.

[30]. Haddad M. Nasri O. Mansouri A. (2020). Effet d'extrait d'écorce de la grenade sur les bactéries lactiques : Synthèse bibliographique. Université 8 mai 1945 Guelma. Mémoire fin de cycle master.

[31]. Spilmon M. (2013). Intérêt de la grenade dans la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose : rôle des fractions lipidiques et poly phénoliques, approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Thèse de Doctorat. France. 173 pages.

[32]. Seeram N. Schulman R. (2006). Pomegranate. Ancient roots to modern medicine. Ed. Taylor and Francis. France. 244 pages.

[33]. Hamid I. (2013). Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de Doctorat. Maroc. 180 pages.

[34]. Jean jacques macheix. (2005). Les composés phénoliques des végétaux.

[35]. Lakas M. Mehaya H. (2020/2021). Propriétés Physico-Chimie et biologique de l'extrait des feuilles de *Gossypium arboreum* et valorisation de leur déchet. Mémoire de Master. Université de Ghardaïa.



Référence Bibliographique

- [36]. Sabrina Krief. (2004). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées.
- [37]. Justin N. K Edmond. S Ally. R. M. and Xin H. (2014). Plant Secondary Métabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2 : 377-392.
- [38]. Donatien K. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction, identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydant. Thèse de doctorat. Université Bamako.
- [39]. Mauro N. M. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) -anatoxine-a et la (±) - camptothécine. Thèse de doctorat en Chimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- [40]. Vincenzo D. L. Pierre L (2001). The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 4:225–233.
- [41]. Jörg Z. Peter J. F. (2008). Alkaloid Biosynthesis :Metabolism and Trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 59 :735-769.
- [42]. Beddou F. (2015). Etude phytochimique et activité biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et biochimie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- [43]. Kyoung S. C. Young-ran L. Kyungho, L. Jaeseok L. Jang H. L. and Im-Soon, L. (2017). Terpenes from Forests and Human Health. *Toxicological Research*, vol. 33, No. 2, pp : 97-106. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.2.097>.
- [44]. Roman P. Martyna K.S. Mariusz T. and Jan F. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare.55 : 315–327. DOI 10.1007/s00005-007-0039-1.
- [45]. Adouane S. (2016). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Thèse de magistère en Sciences Agronomiques. Université Mohamed Khider- Biskra.
- [46]. Haslam E. (1993). Polyphenol complexation. In: « Polyphenolicphenomina». Ed. Scalbert
- [47]. Psotova J. Kolar M. Sousek J. Švagera Z. Vicar J. Ulrichova J. (2003) Biological activities of *Prunella vulgaris* extrac. *Phytother Res* 17:1082-1087.



Référence Bibliographique

- [48]. Bruneton J. (2009). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 4^{ème} édition. Edition *Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris*, p 261, 308, 571.
- [49]. Bamforth P. B. (1999). "The derivation of input data for modelling chloride ingress from 391 eight-year UK coastal exposure trials". *MagConcrRes*.
- [50]. Urquiaga L. et Leighton F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*.
- [51]. Ribereau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, 202p.
- [52]. Daas Amour S. (2009). Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L) et évaluation in vitro de leur activité biologique. Mémoire de Magister en Biologie Option Biochimie appliquée. Université El-Hadj Lakhdar, Batna, Alger.
- [53]. Nkhili E. (2009). Polyphénols de l'alimentation : extraction, interaction avec les ions de fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse doctorat universités CADI AYYAD Semlalia-Marrakech.
- [54]. Harrar A. N. (2012). Activités antioxydant et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire de Magister en Biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbas –Sétif.
- [55]. Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapies*, 4 : 162-169 <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>.
- [56]. Verpoorte R. Alfermann A.W.(2000). Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Edition El Khtwer Academic Publishers, London, pp: 1-29; 128-129.
- [57]. Zimmer N. Cordesse R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions animales, Institut National de la Recherche Agronomique*, 9 (3), pp : 167-179.
- [58]. Jacqueline D. (1978). Les tanins dans les bois tropicaux. *BOIS & FORETS DES TROPIQUES*, pp: 37-54.
- [59]. Bernays E. A. Cooper Driver G. Bilgener M. (1989). Herbivores and Plant Tannins. *Advances in Ecological Research*, vol. 19 : 263-302
- [60]. Benslama a. (2016). Substances d'origine végétale. Université Mohamed Khider-Biskra, Alger.



Référence Bibliographique

- [61]. Braemer L. (1890). Les Tannoides. France :la faculté de médecine.
- [62]. Sabater F. (2012). Détermination d'une dose efficace et d'une dose toxique de tanins condensés dans le contrôle des strongyloses digestives chez les caprins. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. Devant l'Université Paul-Sabatier, Toulouse.
- [63]. Touafe O. étude phytochimique des plantes médicinales du nord et du sud Algériens. Thèse Doctorat. Université Mentouri. Constantine, 2010.
- [64]. Kone D. (2008-2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes, extraction, identification d'alcaloïdes, caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse doctorat chimie organique. Université de Bamako.
- [65]. Belguidoum M. (2011-2012). Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*. Mémoire master académique Université kasdi merbah ouargla.
- [66]. Midoun T. (2010/2011). Extraction des composés phénoliques et étude leur activité antioxydant par le comportement électrochimique. Mémoire fin d'étude université kasdi merbah
Ouargla.
- [67]. Harouche T. Ladraa L. (2022 – 2023). Activité antimicrobienne et propriétés biologiques du grenadier « *Punica granatum L.* ». Mémoire de Master. L'université Frères Mentouri Constantine.
- [68]. Alamshani W. H. Al-Sarraj F. et A Algamdi M. (2023). The inhibitory effect of *Punica granatum* on *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Extended spectrum β -lactamase strains. *Novel Research in Microbiology Journal*, 7(1), 1836-1856.
- [69]. Hanif M. A Nisar. S Khan G.S. Mushtaq Z. Zubair M. (2019). Essential Oils. In: Malik, S. Essential Oil Research, pp : 3-17. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8_1
- [70]. Grassier J. Haziz C-M. (2000). Biologie, nutrition, alimentation. Science médicosociale. Edition Masson, Paris p.370.
- [71]. Le Hir. (2009). Vie d'un médicament de la conception aux bonnes pratiques de fabrication : Abrégés de pharmacie galénique, Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 9ème édition, Masson, pp : 4-8.
- [72]. Koffi a. et al. Développement galénique d'une pommade à base d'huile de. Educ 2007.



Référence Bibliographique

- [73]. Guede-Guina F. Kra M.A. Vangah-Manda M., Bonga M.(1997).Inhibition par Misca-F2 de la croissance d'Aspergillus Fumigatus, Candida Albicans et de Cryptococcus Neoformans :trois germes opportunistes. Afrique biomédicale ;2(1)Page 11 -16 .
- [74]. <https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/glossaire/article/principe-actif-ou-substance-active>
- [75]. Gross J. Highberger J. H. et Schmrr. F. O.(1952). Some factors involved in the fibrogenesis of collagen in vitro Proc. Soc. exp. Biol.(N.Y .).80.pages 462_465.
- [76]. Kerdudo A (2014). Optimisation de la conservation des cosmétiques : impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation. Thèse pour obtenir le titre de docteur en Sciences de l'université de Nice – Sophia Antipolis CHIMIE, 232p.
- [77]. Akdim L. (2017) : « Comparaison de méthodes d'absorption et d'encapsulation de l'huile essentielle de Copaifera Officinalis L. en vue d'une application en cosmétique. Travail de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master bioingénieur en Sciences agronomiques. Autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech, 54p.
- [78]. Desai K.G.H. Park H. J.(2005).Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Drying Technol 23: 1361–94.
- [79]. Richard J. Benoit JP. 2000.Microencapsulation. Tech. Ing. J 2210: 1–20.
- [80]. Theron. (2009). Conception et mise en œuvre d'un procédé intensifié. Continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale. Thèse doctorat, L'université de Toulouse.
- [81]. Richard J. Benoit J -P. (2000). « Microencapsulation, techniques de l'ingénieur », J-2210.1-20.
- [82]. Frédéric L. (2003). Modèle pharmacocinétique -pharmacodynamique pour décrire la neutropénie induite par le topotecan. Thèse doctorat. L'université de Toulouse.
- [83]. Bérengère D. (2015). La libération modifiée de principes actifs, développement de deux approches. Thèse doctorat. L'Université du Droit et de la Santé.
- [84]. Hoffman AS. (2008). The origins and evolution of « controlled » drug delivery systems. Controlled Release, 153-63.
- [85]. Boudendouna AH. (2010). Méthodologie de la formulation d'une forme orale solide à libération prolongée. Institut national polytechnique, (246).
- [86]. Professeur Jean-Louis Cuq. Cours chromatographie liquide, Université Montpellier (2001).
- [87]. <https://chimactiv.agroparistech.fr/fr/bases/hplc/theorie-illustree/3>



Référence Bibliographique

- [88] . Mollick M.M.R. Rana D. Dash S K. Chattopadhyay S. Bhowmick. B. Maity D. Mondal D. Pattanayak, S. Roy S. Chakraborty M. (2015). Studies on green synthesized silver nanoparticles using *Abelmoschus esculentus* (L.) pulp extract having anticancer (in vitro) and antimicrobial applications. *Arabian journal of chemistry*.
- [89]. Courage Sedem Dzah, Haihui Zhang. Vera Gobe. David Asante-Donyinah, Yuqing Duan. Anti- and pro-oxidant properties of polyphenols and their role in modulating glutathione synthesis. activity and cellular redox potential : potential synergies for disease management, *Advances in redox research*. volume 11, 2024.
- [90]. belkadi T. makked L . Traitement des margines d'olives par co-precipitation en utilisant les plans d'expériences [Mémoire de Master. Université de Tizi-Ouzou, Faculté des sciences ,2016. P13
- [91]. Pratique industrielle de la méthode taguchi. Les plans d'expériences. Ed 1995 AFNOR
- [92]. Chibane, H. R. Serra. R. Leroy. (2011). Mise en uvre d'une optimisation multi objectif en tournage d'un acier 100C6 : compromis entre qualité de surface et productivité. 20ème Congrès Français de Mécanique, 28 août/2 sept. 2011-25044 Besançon, France (FR).
- [93]. Firdaws R. Kaoutar B. (2020-2021). Utilisation le plan d'expérience de Box-Behnken pour optimiser les différents facteurs influençant sur le séchage de la pomme de terre. Mémoire Master Académique. L'université Kasdi-merbah Ouargla.
- [94]. Nathalie Boizot. Jean-Paul J.-P. Charpentier. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 2006, pp.79-82. Hal02669118.
- [95]. https://www.researchgate.net/figure/Reaction-of-flavonoid-Aluminium-Chloride-AlCl3-complex-formation-23_fig1_341932707.
- [96]. Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) forestimating antioxidant activity. *Songklanakarim J .Sci .Technol*, 26, 211 – 219. Moon
- [97]. <https://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>
- [98]. <https://www.laboratuar.com/fr/testler/kimyasal-testler/yukse-performansli-sivi-kromatografisi-%28hplc%29-test-laboratuvari/>
- [99]. Omez-caravaca, A.M. Gomez-romero M. Arraez-roman D. Seguracarretero A. Fernandez-gutierrez, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41:1220-1234.
- [100]. Belalem W. Ben nadir K. (2020). Synthèse et caractérisation d'un film de poly (éthylène succinate) biodégradable. Université de Ghardaïa. En vue obtention de mémoire master.



Référence Bibliographique

- [101]. <https://www.techniques-ingenieur.fr/glossaire/dextrine>
- [102]. Hachemaoui W. Amirouche L. (2017). Microencapsulation d'un principe actif (Amlodipine) dans la matrice Chitosane/HPMC réticulé par le procédé de double émulsion H/E/H. en vue l'obtention de mémoire master. Université a. Mira de Bejaia.
- [103]. <https://www.fishersci.fr/fr/fr/browse/80013636/dichlorom%C3%A9thane?page=1>
- [104]. Allag S. Tafer N. (2020). Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de cinq plantes appartenant au genre Centaurea. Mémoire de fin d'étude master. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- [105]. https://salenixvs.live/product_details/12812902.html
- [106]. Khebichat A. (2012-2013). Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des cendres de bois du chêne vert «Kourriche ou Ballout » (Quercus ilex). Mémoire de fin d'étude master. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen.
- [107]. Benlahrache R. Boukeerzaza, S. (2021-2022). Evaluation de l'activité antibactérienne de deux extraits de la plante Centaurea dimorpha. Mémoire de fin d'étude master. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- [108]. https://www.researchgate.net/figure/Method-dobtention-des-puits-sur-le-milieu-de-culture-solide-Source-Travaux_fig1_341510124
- [109]. Gélose Mueller-Hinton. Version 2018.06. Laboratoires INDICIA. Z.A. La Parlière - 69610 - Saint Genis l'Argentière - France. Tél : +33 (0)4 74 72 36 10. E-mail : contact@indicia.fr. www.indicia.fr
- [110]. Afadjene M. Gouamid H. (2023). La biosynthèse extracellulaire des nanoparticules d'oxyde de zinc par bactérie et leurs applications. Mémoire de fin d'étude master. Université des Frères Mentouri Constantine 1. Université kasdi merbah Ouargla.
- [111]. Belgaid S. Chikhoun L. (2013) étude de l'activité antimicrobienne et antifongique des extraits du phlomis bovei de noe -préparation d'une forme pharmaceutique. Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Annexes



Annexe I

I.1. Matériels et réactifs utilisés

Tableau I.1 : Matériels et réactifs utilisée dans la partie physico-chimique et la partie microbiologique

Réactifs et verreries de la partie physico-chimique		Matériels et réactifs de la partie microbiologique
Verreries	Réactifs	
<ul style="list-style-type: none"> - Erlenmeyer, Fioles jaugées, Béchers. - Cuves en quartz pour l'UV - Eprouvettes graduée, pipette graduée. - Boîtes pétries. - Papier absorbant, papier aluminium, papier wattman, para film. - Poires d'aspiration. - Verres de montre, Entonnoirs, spatules, barreau magnétique, pissette, tubes à essais. - Mortier, tamis de 100um. - Boîtes de pétri - Verres de montre, Entonnoirs, 	<ul style="list-style-type: none"> - Eau distillée. - Ether de pétrole (EP) - Dichlorométhane (DCM). - Méthanol (MeOH). - Ethanol. - Acide acétique. - Standards (acide gallique, quercétine). - Folin Ciucaleu. - DPPH (2,2-déphenyl-1-picrylhydrazyle). - Chlorure d'aluminium (AlCl3). - Carbonate de sodium (NaCO3). - PEG, Dextrine, TPPNa. - Huile de vaseline. - Oxyde de zinc. - Huile de sésame 	<ul style="list-style-type: none"> - Muller- Hinton Agar. - Eau distillée stérile - Boîte de pétri stérile en plastique - Ecouvillon, Pince - Bec bunsen - micropipette, des embouts - Disques stérilisé

I.2. Appareillages utilisés :

- Spectrophotomètre UV-visible.
- Balance analytique de précision à 4 chiffres.
- PH-mètre.
- Dissolu-test.
- HPLC.
- Spectrophotomètre IR.
- Etuve memmert.
- Microscope optique.
- Enceinte de sécurité
- Agitateur magnétique



Annexe II

II.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible

II.1. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes :

Tableau II.1 : Les absorbances (um) de dosage des extraits (polyphénols et flavonoïde).

Extraits	EBEG	DCMEG	EEPEG	EEGA
ABS polyphénols (765nm)	1.5778	0.2864	0.2464	1.9280
ABS flavonoïdes (430 nm)	1.1363	0.7786	-5.6087	1.3783

II.2 Activité antioxydante par la méthode de DPPH

TableauII.2 : Les absorbances de l'activité antioxydant des extraits à 517nm.

Extraits	EBEG	DCMEG	EEPEG	EEGA
ABS pour 0.1ml de DPPH	0.0184	0.0064	0.0102	0.0266
ABS pour 0.8ml de DPPH	0.0576	0.0096	0.0184	0.0894

II.3. La microencapsulation/

Tableau II.3 : Les absorbances (um) des 10 essais de la microencapsulation (polyphénols et flavonoïde)

N° d'essais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ABS polyphénols (765nm)	1.9283	0.3457	0.1713	0.1937	0.0497	0.0535	0.2458	0.9588	0.3942	0.4351
ABS flavonoïdes (430nm)	0.2436	0.538	0.3033	0.299	0.2711	0.8541	0.3318	0.9137	0.6788	0.6794



Annexe III

III. 1. Les chromatogrammes de HPLC des standards (AG, Qr) :

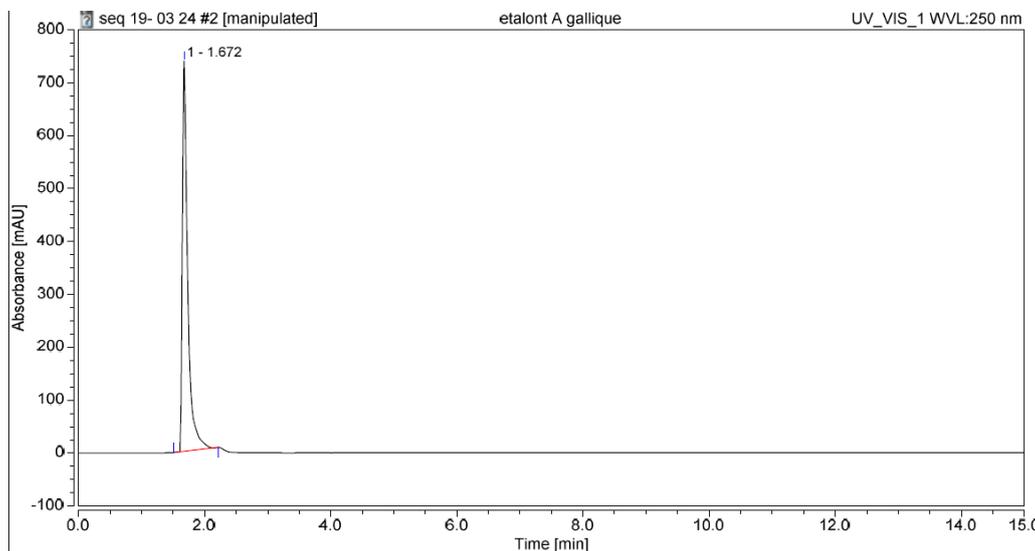


Figure.III.1 : Chromatographie de standard acide gallique.

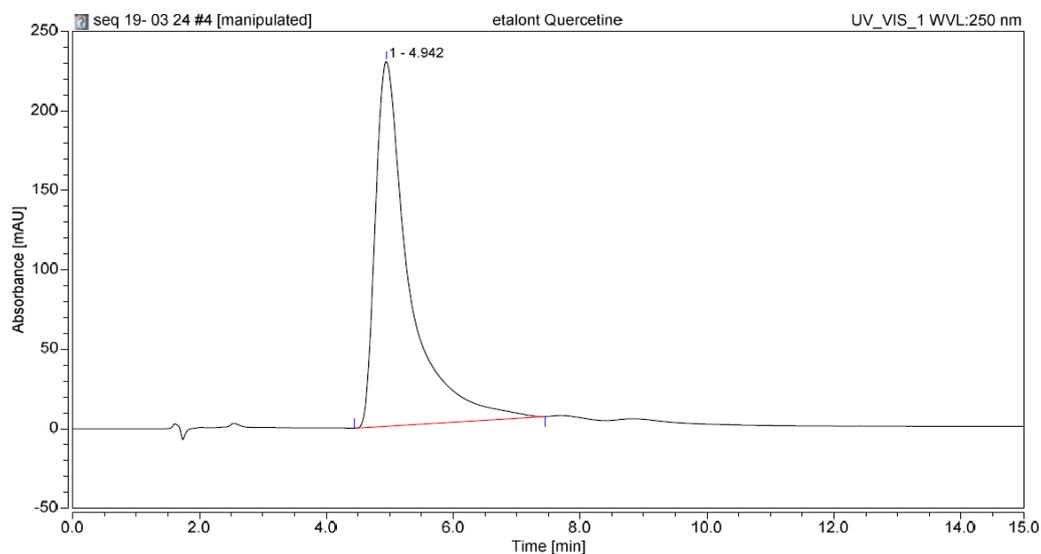


Figure III.2 : Chromatographie de standard quercétine.

III.2. Caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) des filtrats de la microencapsulation :

III.2.1. Dosage des polyphénols par HPLC dans le filtrat d'essai 6 :

Ce : 0.2mg/ml, F = 10, C_{Tot p} = 44.41 mg/ml

AGs : tr = 1.673 min, Aire = 71.868



AG_{E6} :tr= 1.615 et Aire= 270.602

AE_{E6} : tr= 3.405min, Aire = 143.978

Aire Tot= Aire AG + Aire AE \longrightarrow 270.602+143.978 = 414.58

- La concentration des polyphénols dans le filtrat d'essai 6 :

$$C_{PP}^6 = \frac{Aire\ Total}{Aire\ standard} \times Ce \times F$$

$$AN : C_{PP}^6 = \frac{414.58}{71.868} \times 0.2 \times 10 = 11.54\text{mg/ml}$$

➤ Concentration des polyphénols dans l'essai 6 est : 11.54mg/ml

- Taux d'encapsulation par rapport HPLC :

$$EEP\% = \frac{C\ tot\ en\ polyphénols - C\ des\ polyphénols\ dans\ E6}{C\ tot\ en\ polyphénols} \times 100$$

$$EEP\% = \frac{44.41 - 11.54}{44.41} \times 100 = 74\%$$

III.2.2. Les chromatographies des essais de la microencapsulation :

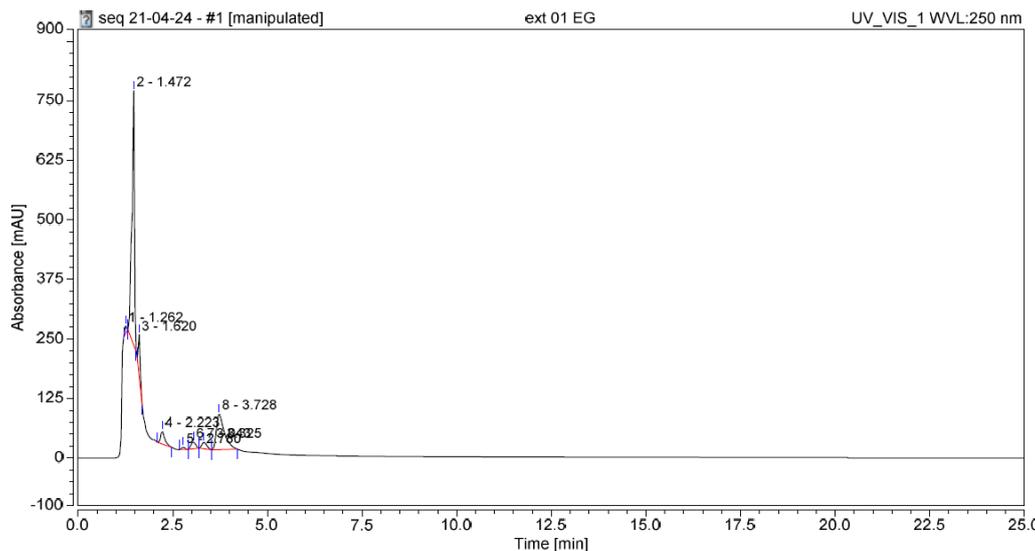


Figure III.3 : Chromatographie de l'essai 1 de la microencapsulation.

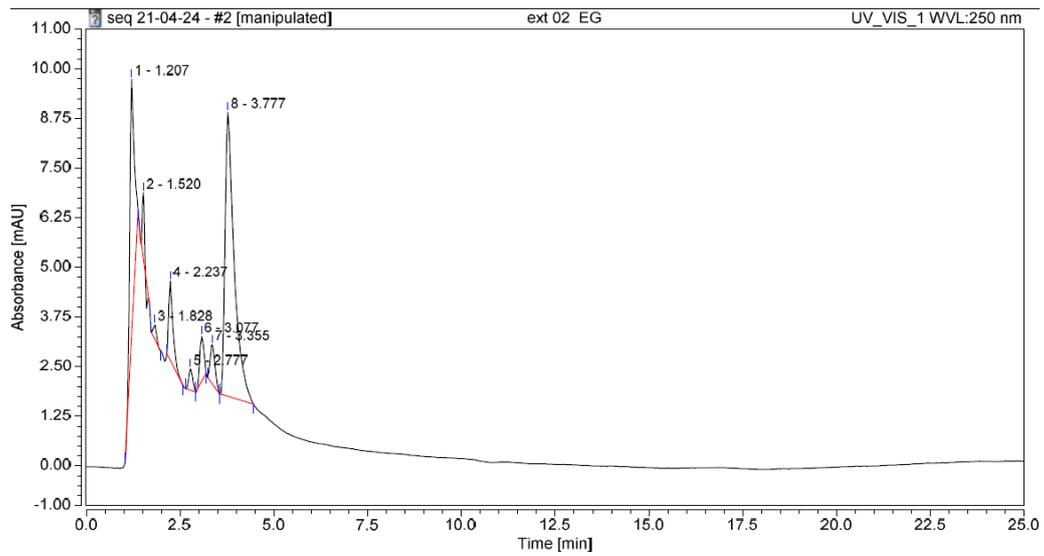


Figure III.4 : Chromatographie de l'essai 2 de la microencapsulation.

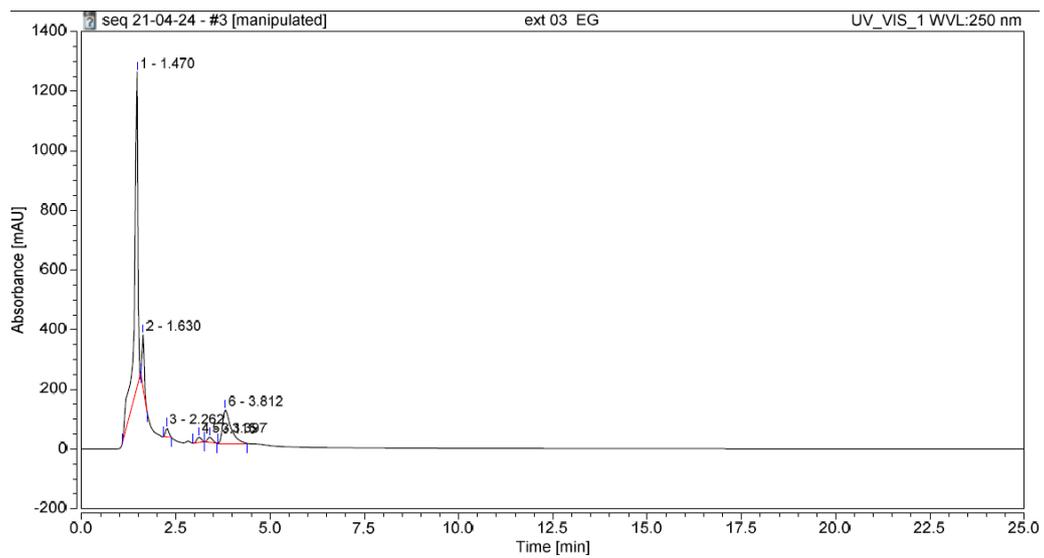


Figure III.5 : Chromatographie de l'essai 3 de la microencapsulation.

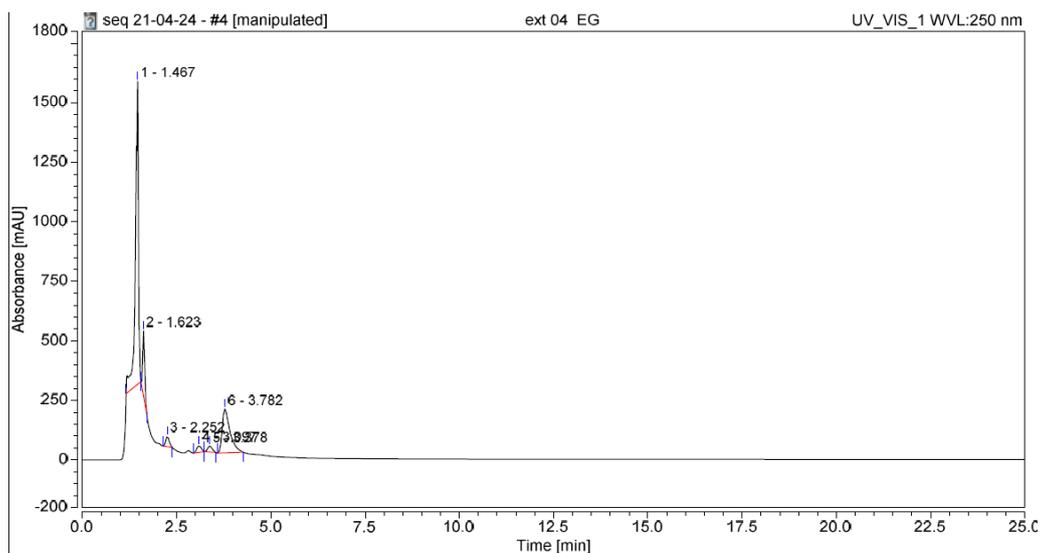


Figure III.6 : Chromatographie de l'essais 4 de la microencapsulation

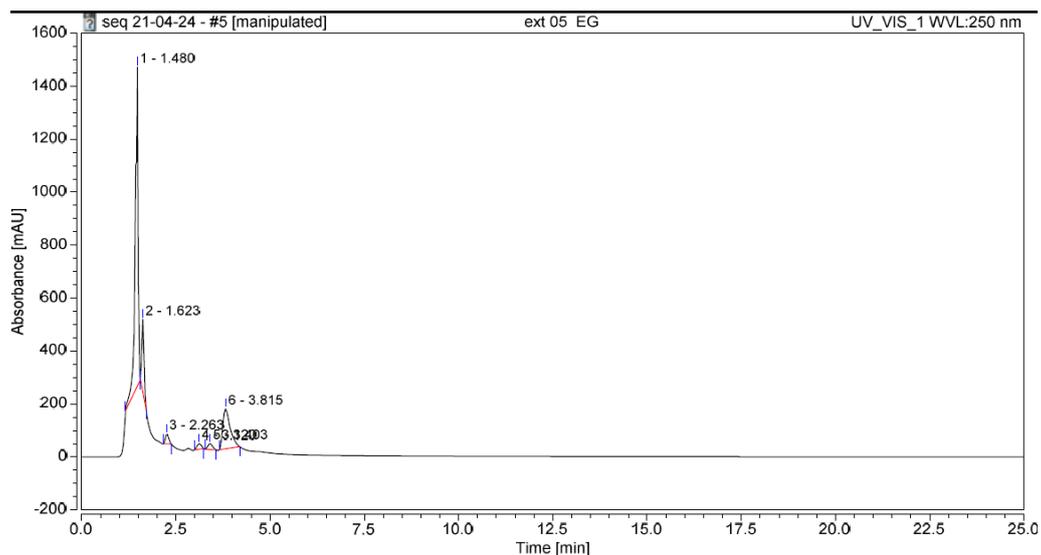


Figure III.7 : Chromatographie de l'essais 5 de la microencapsulation.

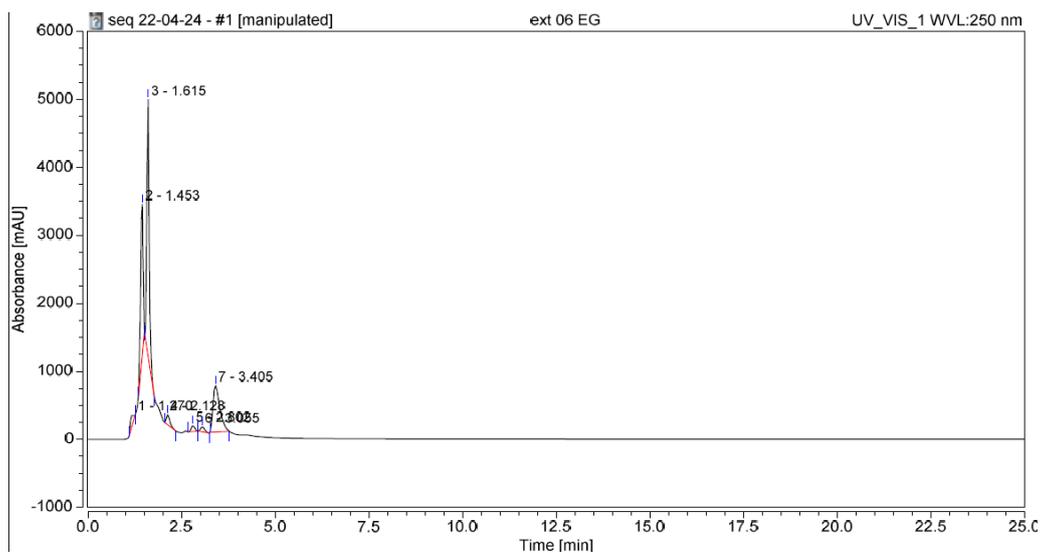


Figure III.8 : Chromatographie de l'essai 6 de la microencapsulation.

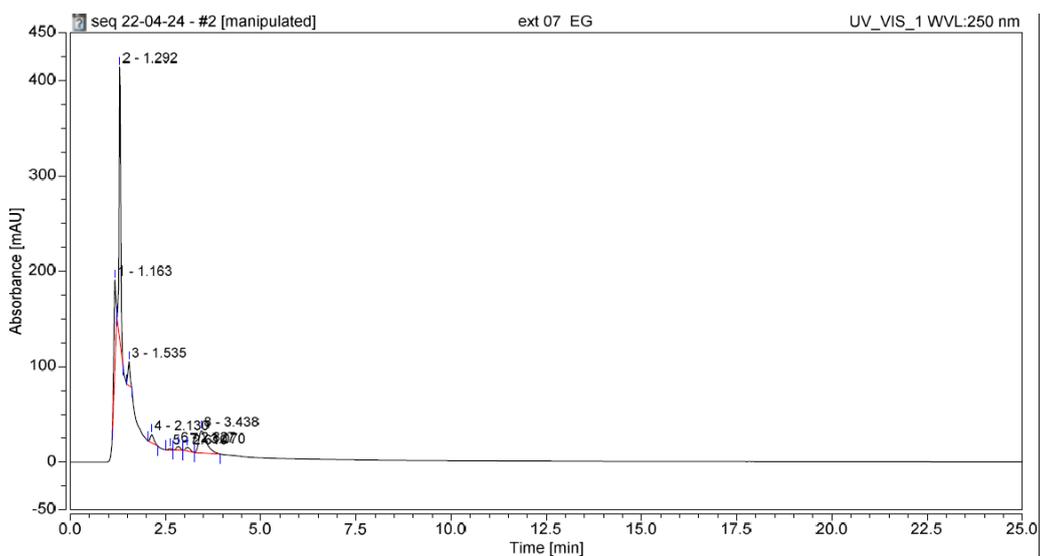


Figure III.9 : Chromatographie de l'essai 7 de la microencapsulation.

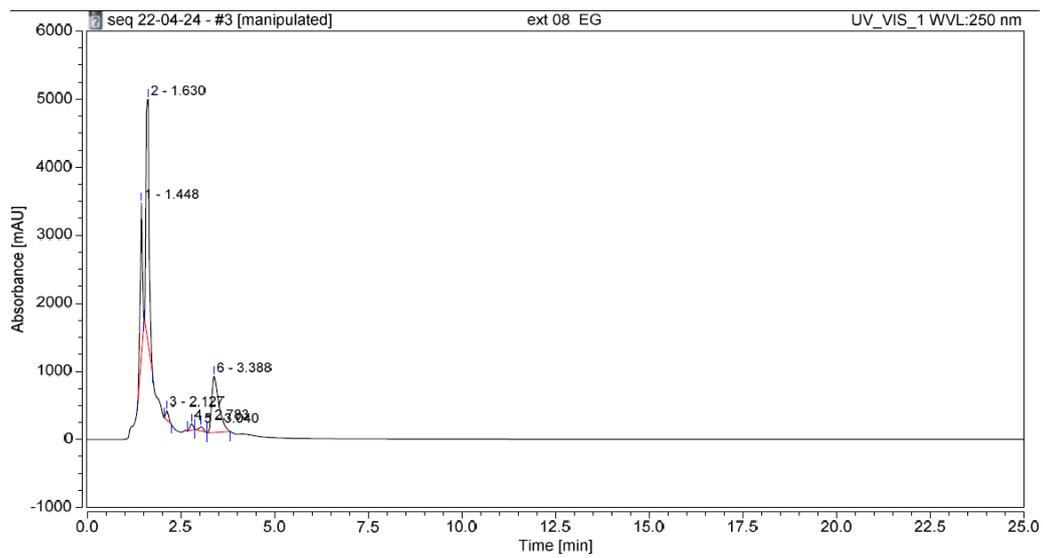


Figure III.10 : Chromatographie de l'essai 8 de la microencapsulation.

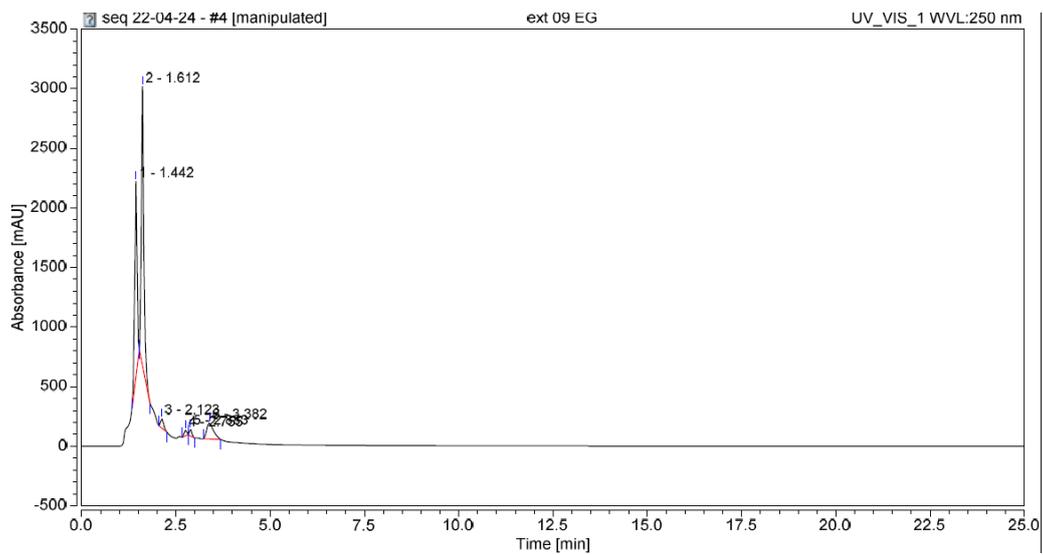


Figure III.11 : Chromatographie de l'essai 9 de la microencapsulation.

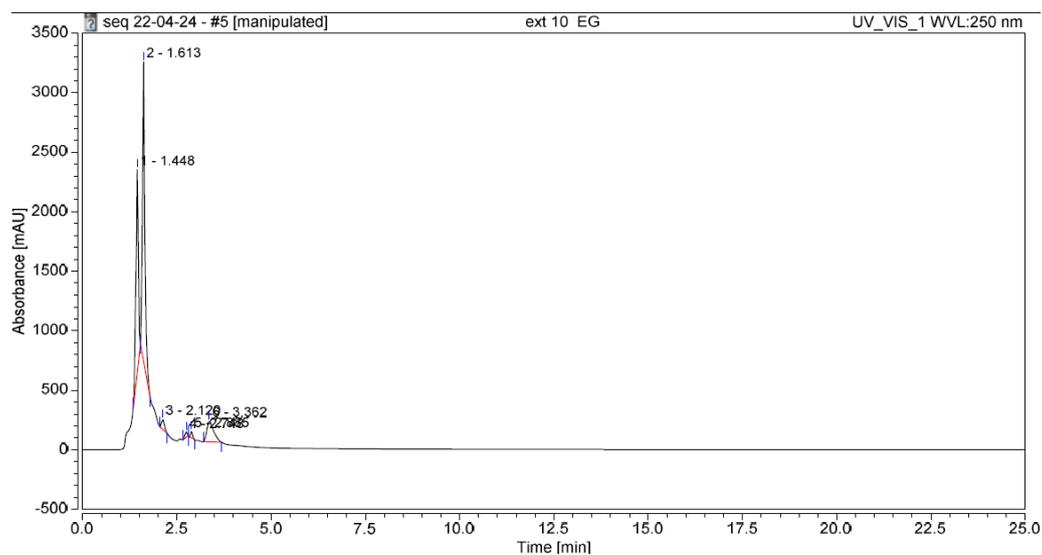


Figure III.12 : Chromatographie de l'essai 10 de la microencapsulation.



Annexe IV

IV.1. La cinétique de libération :

Tableau IV.1 : Absorbance (nm) des polyphénols et flavonoïdes de la cinétique

Temps (min)	EGM6		PEGM6		PEBEG	
	Polyphénol	Flavonoïde	Polyphénol	Flavonoïde	Polyphénol	Flavonoïde
10	0.0091	0.0006	0.052	0	0.0086	0.0211
20	0.0346	0.0114	0.017	0.0189	0	0
30	0.1196	0.0132	0.0338	0.0128	0.0462	0.0098
40	0.0091	0.0182	0.0241	0.012	0.0154	0.069
50	0.0045	0.0093	0.0224	0.0029	0.0119	0.0975
60	0.0204	0	0.0196	0.0094	0.0064	0.0078
80	0.0416	0.0051	0.0171	0.0083	0.0128	0.0004
100	0	0.0056	0.0277	0.0121	0.0093	0.016
120	0.0660	0.0064	0.2645	0.0085	0.0013	0.0113
150	0	0.0204	0.0134	0.007	0.0057	0.254
180	0.0545	0.0319	0.0295	0.0102	0.009	0.0074
210	0.1330	0.0073	0	0.0179	0.005	0.0059
240	0.756	0.0101	0.0111	0.0137	0.004	0.0073

IV.2. Les spectres de IR de l'acide gallique, quercétine et TPPNa :

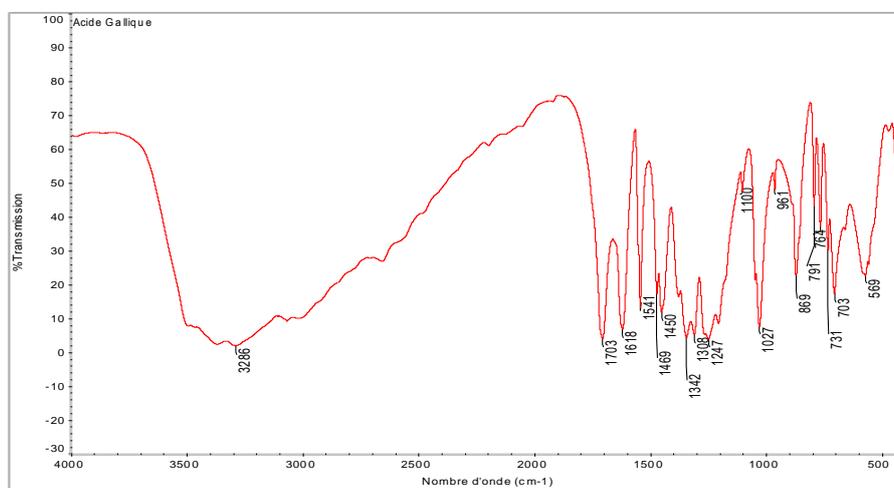


Figure IV.13 : Spectre IRFT de l'acide gallique.

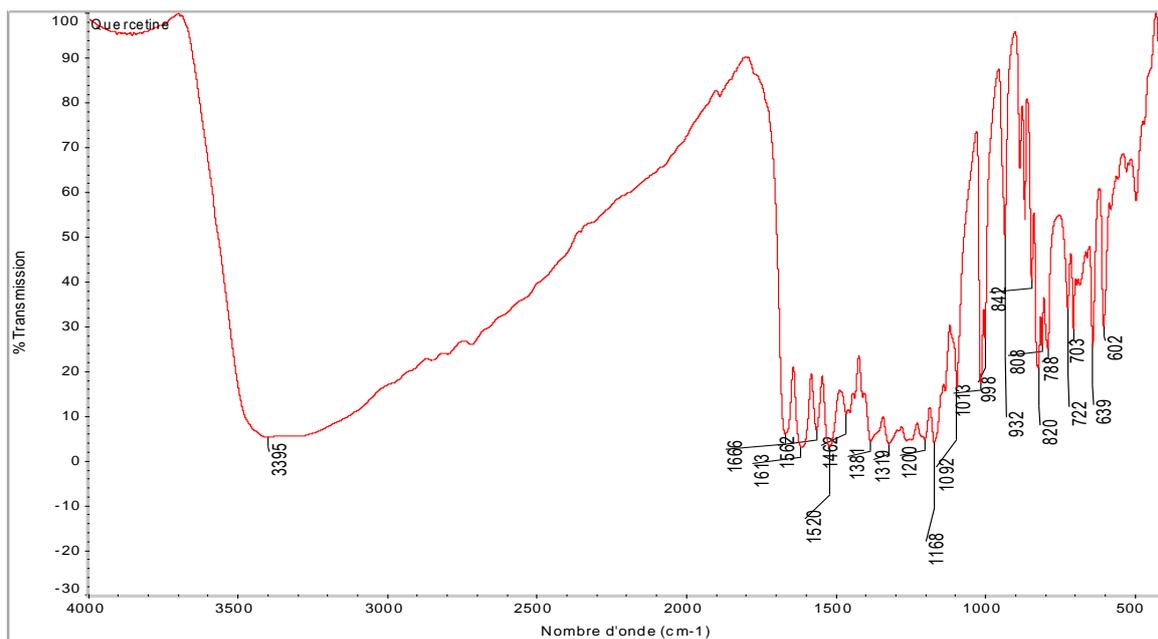


Figure IV.14 : Spectre IRFT de la Quercétine.

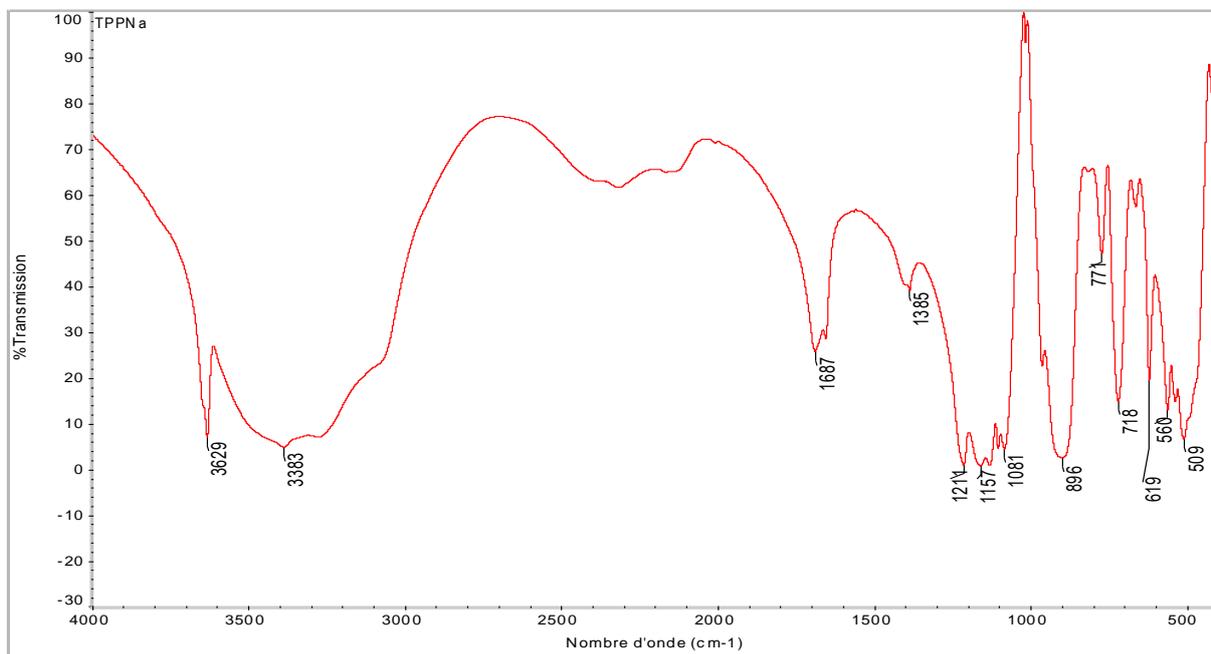


Figure IV.15 : Spectre IRFT de TPPNa.

Résumé

Résumé

Notre recherche se concentre sur l'analyse des extraits de *Punica Granatum L* par des techniques qui ont révélé la présence de plusieurs métabolites (polyphénols, flavonoïdes). Nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits, qui a exhibé un fort pouvoir d'inhibition du radical libre (DPPH°). Des microcapsules de Dextrine/PEG/extrait ont été préparées par émulsion simple et le taux d'encapsulation des polyphénols de plus de 90%, a été optimisé par plan d'expérience factoriel à 3 facteurs (dose- Rp- pH). L'activité antibactérienne de l'extrait brut, des microsphères ainsi que deux formulations différentes de pommade (PEGEB et PEGM6) contre les souches bactériennes *E. coli* et *S. aureus*, a été prouvée. Les résultats montrent une efficacité variable principalement contre les *Staphylococcus aureus* pour toutes les formulations, mais l'activité est nulle ou faible et n'est manifestée que par l'extrait brut contre l'*E. coli*. L'étude cinétique de libération des polyphénols des microcapsules et des pommades montre qu'elle est de type polynomial dû à la matrice gonflante de la dextrine et aux excipients qui ralentissent la vitesse de la cinétique de libération des principes actifs du *Punica Granatum L*. dans le milieu physiologique dermique.

Mots clés : *Punica Granatum L*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne, cinétique de libération, microencapsulation, plan d'expérience.

Abstract

Our research focuses on the analysis of *Punica Granatum L* extracts using spectrophotometric methods, revealing the presence of various chemical groups (total polyphenols, flavonoids). We assessed the antioxidant activity of the extracts, showing a strong ability to neutralize the free radical (DPPH) for polar extracts and also in the non-polar extract EGDCM. Subsequently, we studied a microparticle formulation through microencapsulation of the crude extract via simple emulsion, with statistical analysis conducted using a factorial experimental design and MINITAB software to identify significant factors (dose, Rp, pH) and their impact on the encapsulation efficiency of polyphenols and flavonoids. We evaluated the antibacterial activity of EGM6 and the crude extract, as well as two different ointment formulations (PEGEB and PEGM6) against bacterial strains *E. coli* and *S. aureus* using disc diffusion and well diffusion methods. The results show varying effectiveness primarily against *Staphylococcus aureus* for all substances, with modest activity observed from EBEG against *E. coli*. We also investigated the influence of dermal physiological environment on the in vitro release kinetics of the active principle "punica granatum".

Keywords: Punica Granatum L, active principles, antioxidant activity, antibacterial activity, release kinetics, polyphenols, EBEG, EGM6, PEGEB, PEGM6

ملخص

تركز بحوثنا على تحليل استخلاصات Punica Granatum L باستخدام الطرق الطيفية، مما كشف عن وجود مجموعات كيميائية متعددة (البوليفينولات الكلية، الفلافونويدات). قمنا بتقييم النشاط المضاد للأوكسدة للمستخلصات، مما أظهر قدرة قوية على تعادل الجذر الحر (DPPH) للمستخلصات القطبية وأيضاً في المستخلص غير القطبي. EGDCM بعد ذلك، قمنا بدراسة صياغة للجزيئات الصغيرة من خلال التغليف الجسم للمستخلص الخام من خلال الإمولجن البسيط، وقد تم إجراء تحليل إحصائي باستخدام تصميم تجريبي عاملي وبرنامج MINITAB لتحديد العوامل الهامة) الجرعة، Rp، الرقم الهيدروجيني (وتأثيرها على كفاءة التغليف للبوليفينولات والفلافونويدات. قمنا بتقييم النشاط المضاد للبكتيريا لـ EGM6 والمستخلص الخام، بالإضافة إلى صيغتي مرهم مختلفتين (PEGEB) و (PEGM6) ضد سلالات البكتيريا E. coli و S. aureus باستخدام طريقتي انتشار القرص وانتشار البئر. أظهرت النتائج فعالية متفاوتة بشكل أساسي ضد Staphylococcus aureus لجميع المواد، مع رصد نشاط معتدل من EBEG ضد E. coli. درسنا أيضاً تأثير البيئة الفسيولوجية الجلدية على حركية الإفراج الحيوي للمبدأ النشط. "punica granatum"

الكلمات الرئيسية: Punica Granatum L، مبادئ نشطة، نشاط مضاد للأوكسدة، نشاط مضاد للبكتيريا، حركية الإفراج، البوليفينولات، EBEG، EGM6، PEGEB، PEGM6