REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par

AISSI Fatima
MEZIOUD Siham

Thème

Etude des propriétés physicochimiques et biologiques des extraits des biomasses végétales

Soutenue publiquement le : 20 /06 /2019, Devant le jury composé de :

MAACHOU Hamida	Grade : MCB	Université de Médéa	Président
KERMET SAID Hadjira	Grade : MCB	Université de Médéa	Examinateur
KHALLADI Razika	Grade : MCA	Université de Médéa	Encadreur
ZOUAMBIA Yamina	Grade : MCA	Université de Médéa	Co-Encadreur
Ferrarsa Soumia	Docteur	Invité d'honneur	

Année universitaire : 2018/2019

ملخص

العمل الحالي هو مساهمة في تثمين ثلاثة كتل حيوية وفيرة للغاية في الجزائر , وهي قشر الرمان (صنفان من المدية) واللزاز. تم إجراء الاستخلاص الساخن للمركبات النشطة بيولوجيا باستخدام المذيبات: ماء وإيثانول وماء / إيثانول (50%/50%)على أساس مصفوفة تجريبية من 27 اختبارمقترح من قبل برنامج لتصميم تجريبي . تم اختبار خمسة عوامل بين مستويين : طبيعة المذيب ، درجة الحرارة ، نسبة الصلبة /حجم المذيب ، قطر الجسيمات ووقت الاستخلاص .

تقييم الخصائص الفيزيو-كيماوية والبيولوجية مثل: الفاعل بالسطح ومضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات في المستخلصات المختلفة مكّن من تسليط الضوء على وجود مستويات عالية من السابونين والبوليفينول الكلي والفلافونويد في صنفين من الرمان مقارنة باللزاز.

الدراسة العواملية للاستخلاص أظهرت اعتمادًا وثيقًا بين العوامل المدروسة والأنشطة المستغلة. تم التوصل إلى التوتر السطحي بالقرب من 29دبين/سم للمستخلصات الثلاثة. من اجل الاصل الاول للرمان ، أعلى مستويات البوليفينول والفلافونويد التي تم الحصول عليها بالماء هي: 368.66 (مغ مكافئ حمض الغاليك/ غ) و 704.37 (مغ مكافئ الروتين/غ) على التوالي. في وقت تم الحصول على 430.88 (مغ مكافئ حمض الغاليك / غ) من مجموع البوليفينول و 489.12 (مغ مكافئ حمض الروتين/ غ) من الفلافونويدات مع الإيثانول للأصل الثاني. بالنسبة إلى اللزاز، أفضل مردود للبوليفينول الكلي يساوي 574.55 (مع مكافئ حمض الغاليك/غ) تم الحصول عليها بالماء و 380.62 (مغ حمض الروتين/غ) من الفلافونويدات مع الإيثانول بنسبة وماء / إيثانول (50%/ 50%)

تطبيق هذه المستخلصات كمضادات للأكسدة قد اثبت على تركيز مثبط بنسبة 50 % يساوي 0.0017 مغ/مل للمستخلص الإيثانولي للزاز و 0.0073 ملغ / مل للمستخلص المائي. أظهرت المستخلصات الإيثانولية أقوى تأثير مضاد للبكتيريا ضد *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* مقارنة مع المستخلصات الأخرى. تحتوي مستخلصات كلا نوعين الرمان على نشاط مضاد للجراثيم بشكل ملحوظ مقارنة باللزاز.

الكلمات المفتاحية: الرمان ، اللزاز ، البوليفينول ، الفلافونويد ، السابونين ، التوتر السطحي ، قوة مضادات الأكسدة ، نشاط مضادات الميكروبات.

Résumé

Le présent travail est une contribution à la valorisation de trois biomasses très abondantes en Algérie ; à savoir les écorces de grenade (deux variétés de Médéa) et le daphné garou. L'extraction à chaud des composés bioactifs en utilisant comme solvants : l'eau, l'éthanol et eau/éthanol (50% /50%) a été réalisée sur la base d'une matrice expérimentale de 27 essais proposés par un logiciel de plan d'expérience. Cinque paramètres ont été testés entre deux niveaux ; nature du solvant, température, rapport solide/liquide, diamètre des particules et temps de l'extraction.

L'évaluation des propriétés physico-chimiques et biologiques tel que : l'activité tensioactive, antioxydante et antimicrobienne des différents extraits a permis de mettre en évidence la présence de fortes teneurs de saponine, polyphénols totaux et de flavonoïdes dans les deux variétés de grenade comparativement au daphné garou.

L'étude paramétrique de l'extraction a montré une étroite dépendance entre les facteurs étudiés et les activités exploitées. Une tension superficielle proche de 29dyne/cm a été atteinte pour les trois extraits. Pour la première origine de grenade les teneurs les plus élevées en polyphénols et flavonoïdes obtenues avec l'eau sont : 368.66 (mg EAG/g) et 704.37 (mg ERU/g) respectivement. Cependant, 430.88 (mg EAG/g) de polyphénols totaux et 489.12 (mg ER /g) de flavonoïdes sont obtenus avec l'éthanol pour la deuxième origine. Concernant le daphné garou le meilleur rendement en polyphénol totaux est égale à 574.55 (mg EAG/g) obtenus avec l'eau et 380.62 (mg ER /g) de flavonoïdes avec l'éthanol 50%.

L'applicabilité de ces extraits comme antioxydants a été prouvée par une concentration inhibitrice de 50% égale à 0.0017 mg/ml pour l'extrait éthanolique de daphné garou et 0.0073 mg/ml pour l'extrait aqueux. Les extraits éthanoliques ont montré un effet antibactérien le plus important vis-à-vis du *Staphylococcus aureus* et l'*Escherichia coli* par rapport aux autres extraits. Les extraits des deux variétés de grenade possèdent tous une activité antibactérienne remarquable comparé au daphné garou.

Mots clés : Grenade, daphné garou, polyphénol, flavonoïde, saponine, tension superficielle, pouvoir antioxydant, activité antimicrobienne.

Abstract

The present work is a contribution to the valorization of three very abundant biomasses in Algeria; namely the pomegranate peel (two varieties of Medea) and the Flax-leaved. The hot extraction of bioactive compounds using solvents: water, ethanol and water / ethanol (50% / 50%) were carried out on the basis of an experimental matrix of 27 tests proposed by a software of experimental design. Five parameters were tested between two levels; nature of the solvent, temperature, solid / liquid ratio, particle diameter and extraction time.

The evaluation of the physicochemical and biological properties such as: surfactant, antioxidant and antimicrobial activity of the various extracts made it possible to highlight the presence of high levels of saponin, total polyphenols and flavonoids in the two pomegranate varieties compared to the Flax-leaved.

The parametric study of the extraction showed a close dependence between the factors studied and the exploited activities. A surface tension close to 29dyne / cm was reached for the three extracts. For the first pomegranate origin, the highest levels of polyphenols and flavonoids obtained with water are: 368.66 (mg EAG / g) and 704.37 (mg ERU / g) respectively. However, 430.88 (mg EAG / g) of total polyphenols and 489.12 (mg ER / g) of flavonoids are obtained with ethanol for the second origin. For the Flax-leaved the best yield of total polyphenol is equal to 574.55 (mg EAG / g) obtained with water and 380.62 (mg ER / g) of flavonoids with ethanol 50%.

The applicability of these extracts as antioxidants was proven by an inhibitory concentration of 50% equal to 0.0017 mg / ml for the ethanolic extract of Flax-leaved. and 0.0073 mg / ml for the aqueous extract. Ethanolic extracts showed the strongest antibacterial effect against Staphylococcus aureus and Escherichia coli compared to other extracts. The extracts of both varieties of pomegranate all have remarkable antibacterial activity compared to Flax-leaved.

Key words: pomegranate, Flax-leaved, polyphenol, flavonoid, saponin, surface tension, antioxidant potency, antimicrobial activity.

Remerciements

Avant tout

Nous remercions Dieu de nous avoir donné le courage, la Patience et la volonté pour parachever ce travail.

Nos sincères remerciements et reconnaissances à nos parents

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promotrice Mme KHALADI.R pour son encadrement, sa disponibilité, son aide, ses précieux conseils et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous tenons à exprimer ma très grande considération A notre co-promotrice Mme ZOUAMBIA.Y pour sa disponibilité, son aide, ses précieux conseils et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.
Nous vous remercie, tout particulièrement, pour vos grandes qualités humaines ses connaissances scientifiques vous êtes modèle de compétence professionnelle.

Mes sincères remerciements s'adressent à la présidente du jury Mme MAACHOU Hamida de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury
Que Mme KERMET Said Hadjira reçoive nos sincères remerciements pour avoir accepté d'examiner mon travail
Nous tenons aussi à remercier également Mme FERARSA.S. Pour son aide, son soutien moral et pour ses précieux conseils et orientations.
Sans oublier Mme BRAHMI BENHOUARI Nassira et BOUKARA Karima.

Nous remerciements aussi aux membres de laboratoire.

En fin je tiens à exprimer, mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.
Merci à tous et toutes.

Dédicace

JE dédie ce modeste travail qui n'aurait pu aboutir et voir La lumière sans l'aide de Dieu le tout puissant a :

Ma très chère et douce mère et mon père qui m'ont toujours Encouragées de poursuivre mes études malgré les difficultés que j'ai Rencontrées, que Dieu les gardes en bonne santé.

Merci ma mère, merci mon père

A mes très chères frères: Omer, Mohamed, Hamza, Ibrahim.

A mes très chères sœurs: Meriem, Hakima, Amina.

Pour ma nièce et mes neveux : Kholoud, Younes, Idriss.

A toute ma famille AISSI

A celle qui m'a beaucoup aidé pour la réalisation de ce mémoire :

Ma chère et mon binôme : Siham

Ma chère : Nassira

A tous mes amis

Avec vous je passe des bons moments

A tous mes enseignants de l'école primaire jusqu' à l'université

A toute ma promotion 2018-2019 sans exception.

Fatima

Dédicace

Je dédie ce modeste travail qui n'aurait pu aboutir sans l'aide de Dieu à toutes les personnes que j'aime :

A la lumière de mes yeux, et le bonheur de ma vie. A ma mère

Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien qu'elle m'a donnés confiance, et sécurité.

A mon père Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras et pour son enseignement continu.

Mes chers parents que Dieu vous garde.

A mes chers frères : Mohammed, Hakim, Amine.

A ma chère petite sœur : Sabrina.

Pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A mon futur mari tu étais présent, pour m'écouter, m'encourager, me soutenir, pour écarter les doutes et partager les joies. Tu as relancé ma motivation pour continuer. Merci Houssine

A leur famille ZAOUI.

A mes chers grande père et grande mère que Dieu les gardes en bonne santé.

A les esprits de mes grands parents.

A mes tantes et oncles, et leurs enfants je vous dédie particulièrement:

Dhahbia, chérifa, fouzia.

A tous la famille MEZIOUD et LAKHDARI

A mes fidèles amies :

Ma très chère et mon binôme : Fatima

Mes chères : Nassira, sarah et mon camarade : Rim et sa belle fille.

A toutes mes amies. Avec vous je passe des bons moments et jours.

A tous mes enseignants tout au long de mes études.

Siham

Table des matières

Résumés (arabe, français et anglais)

Remerciements

Dédicace

Abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION GENERALE……1

CHAPITRE I. GENERALITE SUR LES BIOMASSES ETUDIEES

I.1.Grenade ….……2

I.1.1.Description de la grenade ……..2

I.1.1.1.Origine ……....2

I.1.1.2. Noms vernaculaires ……...2

I.1.1.3. Classification ……2

I.1.1.4. Représentation ……...3

I.1.2. Composition des différentes parties de grenade……3

I.1.3. Valeurs nutritives de grenade ……...4

I.1.4. Propriétés pharmacologique …… ……...5

I.1.5. Autres usages de grenade ……...8

I.2.Daphné Garou ……...8

I.2.1.Description de *Daphnegnidium* (DGL)……..8

I.2.1.1.Origine ……8

I.2.1.2. Noms vernaculaires……9

I.1.1.3.classification ……...9

I.2 .1.3.Représentation ……...9

I.2.2.Composition et propriétés biologiques……10

I.2.3. Propriétés pharmacologique ……...10

I.2.4. Autres usages de daphné garou ……...13

CHAPITRE II : POLYPHENOLS ET LEURS METHODES D'EXTRACTIONS

II.1. Polyphénols ……...……...14
II.1.1. Généralités..……..…….....14
II.1. 2. Rôle des polyph1énols chez les plantes ……...14
II.1. 3. Propriétés chimiques des polyphénols……..14
II.1. 4. Propriétés biologiques des polyphénols ……...15
II.1.4.1. Activité antibactérienne ……15
II.1.4.2. Activité antioxydant ……15
II.1.5. Classification des polyphénols……...……16
II.1.6. Principaux composés phénoliques des biomasses étudiées….....18
II.1.6.1. Flavonoïde ……....18
II.1.6.2. Anthocyanes ……18
II.1.6.3. Tanins ……19
II.1.6.4. Coumarines ……....19
II.1.6.5. Saponines……....20
II.2. Méthodes d'extraction des composés phénoliques ……20
II.2.1. Méthodes classiques……..21
II.2.1.1. Macération……..21
II.2.1.2. Extraction par Soxhlet……...21
II.2.2. Les Méthodes alternatives ……...22
II.2.2.1. Extraction assistée aux ultrasons……23
II.2.2.1. Extraction assistée par microondes……...24
II.3. Travaux antérieurs sur l'extraction des composés phénoliques à partir de grenade et de daphné garou…….. ……25

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Introduction ……27
III.2.Matériels et produits utilisés……..27
III.3.Matériel végétal ……..28
III.3.1. Récolte et préparation La matière végétale……..28
III.3.2.Préparation et caractérisation de la matière végétale……28
A. Séchage de la matière végétale……28
B. Broyage et tamisage du matière végétale.……..30

III.4. Extraction des composés phénoliques ……33
III.4.1. Mise au point du domaine expérimental…….. 34
III.4.2. Protocole expérimental…….....35
III.5. Caractérisation des extraits ……36
III.5.1. Caractéristiques organoleptiques……..36
III.5.2. pH des extraits ……..37
III.5.3. Conductivités des extraits.……38
III.6. Analyse quantitative : dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes……...39
III.6.1. Dosage des polyphénols totaux ……39
III.6.1.1. Principe……..39
III.6.1.2. Protocol expérimental……40
III.6.1.3. Calcul……40
III.6.1.4. Résultats……41
A. Effet du solvant…….....41
B. Effet du rapport solide/liquide ……42
C. Effet de la température ……43
D. Effet du diamètre des particules …….....43
E. Effet du temps d'extraction ……44
III.6.2. Dosage des flavonoïdes totaux…… 45
III.6.2.1. Principe……. 45
III.6.2.2. Protocol expérimental ……...45
III.6.2.3. Calcul ……45
III.6.2.4. Résultats…… 46
III.7. Evaluation des propriétés tensioactives……...47
III.7.1. Test de moussage……..47
III.7.2. Tension superficielle…….49
III.7.2.1. Principe et méthode ……...49
III.7.2.2. Résultats ……49
A. Effet du solvant d'extraction ……....49
B. Effet du rapport solide/liquide…….....50
C. Effet de la température……. 51
D. Effet du diamètre des particules……52
E. Effet du temps d'extraction……...52
III.8. Evaluation de l'activité antioxydante ……..53

III.8.1. Principe de la méthode du piégeage du radical DPPH……..53
III.8.2. Protocole opératoire……..54
III.8.3. Résultats et discussion……..55
III.9. Evaluation de l'activité antibactérienne……...57
III.9.1. Mode opératoire……58
III.9.2. Résultats et discussions……59
Conclusion générale…….....63
Références bibliographique
Annexes

Liste des Abréviations et symboles

Abréviation	Signification
AG	Acide gallique
CCF	Composite Centered Face
CI_{50}	Concentration inhibitrice 50 %
Dp	diamètre de pore
DGL	*Daphnegnidium L*
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
EAG	Equivalant acide gallique
EPSP	
ES	Extraction par Soxhlet
ESC	Extraction par solvant à chaud
EU	Extraction par ultrason
I	Inhibition
Mp	Masse de la poudre
MO	Extraction par Micro-onde
PH	Potentiel d'Hydrogène
PGL	Punicagranatum L
PPT	polyphénols totaux
R	Rendement
RU	Rutine
s/l	Solide/liquide
T	Température
TF	Teneur en flavonoïdes
TPP	Tteneur en polyphénols
TS	Tension superficielle
UV	Ultraviolet
vs	Volume de solvants

Liste des tableaux

Tableau	Titre du tableau	Page
Chapitre I : Généralité sur les biomasses étudiée		
Tableau I.1	Classification du grenadier	**2**
Tableau I.2	Composition nutritionnelle de la partie comestible	**5**
Tableau I.3	Propriétés pharmacologiques des différentes parties du grenadier	**6**
Tableau I.4	Classification de daphné garou	**9**
Tableau I.5	Propriétés pharmacologiques des différentes parties du DGL	**11**
Chapitre II : Polyphénols et leurs méthodes d'extraction		
Tableau II.1	Principales classes des composés phénoliques	**16**
Tableau II.2	Résumé de quelques travaux effectués sur l'extraction des composés phénoliques à partir des deux biomasses étudiée	**26**
Chapitre III : Etude expérimentale : Résultats et discussions		
Tableau III.1	Matériels et produits utilisés	**27**
Tableau III.2	Résultats de mesure de l'humidité des biomasses étudiées	**29**
Tableau III.3	Caractéristiques organoleptiques des poudres des biomasses étudiées	**31**
Tableau III.4	Définition des facteurs et leurs niveaux	**34**
Tableau III.5	Matrice d'expériences	**35**
Tableau III.6	Caractéristiques organoleptiques des extraits	**37**
Tableau III.7	Résultats des Ph	**38**
Tableau III.8	Résultats de la conductivité	**39**
Tableau III.9	Hauteurs de la mousse	**48**
Tableau III.10	Valeurs des CI_{50} des différents extraits testés	**56**
Tableau III.11	Souches microbiennes	**57**
Tableau III.12	Test de sensibilité des souches étudiées aux extraits de PGL1	**60**
Tableau III.13	Test de sensibilité des souches étudiées aux extraits de PGL2	**61**
Tableau III.14	Test de sensibilité des souches étudiées aux extraits de DGL	**62**

Liste des figures

Figure	Titre de la figure	Page
Chapitre I : Généralité sur les biomasses étudiée		
Figure I.1	Fruit de grenade et ses différentes parties	**3**
Figure I.2	Principaux constituants des différentes parties de la grenade ou de leur extrait	**4**
Figure I.3	Plante de Daphné garou	**10**
Chapitre I : Polyphénols et leurs méthodes d'extraction		
Figure II.1	Exemples des structures chimiques des anthocyanes	**19**
Figure II.2	Structure de base des saponines	**20**
Figure II.3	Extracteur de Soxhlet	**22**
Figure II.4	Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique	**23**
Figure II.5	Principe de chauffage par microondes	**24**
Chapitre III : Etude expérimentale : Résultats et discussions		
Figure III.1	Plantes utilisées dans cette étude	**28**
Figure III.2	Matière végétale séchée	**29**
Figure III.3	Broyage de la matière végétale : **A** : PGL, **B** : DGL	**30**
Figure III.4	Série de tamis	**32**
FigureIII.5	Diamètre moyen de la poudre de la poudre	**33**
Figure III.6	Macération à chaud	**36**
Figure III.7	Opérations de filtration (A, B) et de centrifugation (C) des extraits	**36**
Figure III.8	Dosage des polyphénols totaux	**40**
Figure III.9	Effet des solvants sur l'extraction des polyphénols totaux	**41**
Figure III.10	Effet du rapport solide/liquide sur l'extraction des polyphénols totaux	**42**
Figure III.11	Effet de la température sur l'extraction des polyphénols totaux	**43**
Figure III.12	Effet du diamètre des particules sur l'extraction des polyphénols totaux	**43**
Figure III.13	Effet du temps de contact sur l'extraction des polyphénols totaux	**44**
Figure III.14	Etapes du dosage des flavonoïdes totaux	**45**

Figure III.15	Teneur en flavonoïdes des écorces de grenades	**46**
Figure III.16	Teneur en flavonoïdes de DGL	**47**
Figure III.17	Test de moussage **(1)** Extrait Ethanol**; (2)** Extrait d'éthanol 50%**; (3)** Extrait d'eau	**48**
Figure III.18	Tensiomètre Du Nouy	**49**
Figure III.19	Effet du solvant sur le Tension superficielle	**50**
Figure III.20	Effet du rapport solide/liquide sur le Tension superficielle	**51**
Figure III.21	Effet de la température sur le Tension superficielle biomasse végétale	**51**
Figure III.22	Effet du diamètre des particules sur le Tension superficielle	**52**
Figure III.23	Effet du temps sur le Tension superficielle	**53**
Figure III.24	Réaction du DPPH avec un antioxydant	**54**
Figure III.25	Protocole expérimental du dosage DPPH	**55**
Figure III.26	Activité antioxydante des différents extraits	**56**
Figure III.27	Différentes étapes d'antibiogramme	**58**

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes médicinales forment un héritage inestimable dans toutes les étapes de l'évolution de l'humanité. Pour le Continent africain 80% de populations, utilisent la médecine traditionnelle à base de ces plantes pour faire face aux problèmes de santé.

De nombreux composés naturels isolés à partir des plantes tels que la grenade et daphné garou ont démontré un large spectre d'activités biologiques. Parmi ces différents types de substances naturelles les composés phénoliques (principalement flavonoïdes, acides phénoliques et tannins) constituent une richesse largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. **[1]**

Punica granatuim L et *daphne gnidium L* sont des plantes médicinales qui possèdent des propriétés thérapeutiques comme l'activité antibactérienne, antioxydante et anti-inflammatoire.

Donc, l'objectif de notre travail est l'utilisation de deux biomasses locales (les écorces de *Punica granatuim L* et les feuilles de *daphne gnidium L*) pour l'extraction des biomolécules de valeur ajoutées. Il s'agit des polyphénols totaux et des flavonoïdes. Les propriétés antioxydante et antibactérienne et tensioactive de ces biomolécules ont été également évaluées.

Pour ce faire, notre étude est divisée en deux parties :

- La première partie représente une revue bibliographique sur les deux espèces utilisées *Punica granatuim L* et *daphne gnidium* ainsi que sur les polyphénols et leur méthode d'extraction.
- La deuxième partie englobe les différentes méthodes suivi et matériels utilisées au cours de notre travail expérimental ainsi que les résultats obtenus avec leurs interprétations.

En fin, nous terminons par une conclusion générale et quelques perspectives.

Chapitre I

Généralité sur les biomasses étudiées

I.1.Grenade

I.1.1.Description de la grenade

I.1.1.1.Origine

La grenade (*Punicagranatum L*) (PGL), en latins *Promus* et *Granatus*, ce qui signifie une tête de série ou de pomme granulaire, originaire de l'Iran à l'Himalaya dans le nord de l'Inde, où elle a été cultivée depuis des milliers d'années. Il y a plus de 1000 cultivars de *Punicagranatum*, qui sont passés de l'Iran, à l'est en Chine et en Inde et à l'ouest par la région méditerranéenne, sur le sud-ouest américain, la Californie et le Mexique **[2,3]**.

La grenade est globalement cultivée dans de nombreuses régions géographiques, en répondant aux besoins nutritionnels et médicinales des populations des différents pays comme l'Iran, l'Inde, l'Egypte, la Chine, Israël, la Tunisie, la Syrie, le Liban, la Turquie, la Grèce Chypre, l'Italie, la France, l'Espagne, le chili, le Portugal, les Etats-Unis, Oman et plus récemment en Afrique du Sud. **[4,5,6]**.

I.1.1.2. Noms vernaculaires

La grenade est connue par plusieurs noms, parmi eux on cite **[7,8,9]**.

En Arabe : Romman

En Français : Grenadier « Fruit: Grenade»

En anglais : Pomegranate

I.1.1.3. Classification

La classification est décrite dans le tableau I.1 **[10].**

Tableau I.1 : Classification du grenadier

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae
Genre	Punica
Espèce	Punicagranatum

I.1.1.4. Représentation

La grenade, fruit du grenadier, est délimitée par un péricarpe épais (ou peau), à l'intérieur duquel sont contenus de nombreux arilles. Chacun est constitué d'une graine (ou pépin) entourée de jus translucide renfermé par une très fine membrane. Les arilles sont rencontres dans des loges séparées par de minces membranes qui s'étendent à l'intérieur du fruit, prenant naissance au niveau du péricarpe et constituant ainsi une base pour l'attachement des arilles (Figure I.1) **[11]**. Le fruit donne donc naissance à trois parties bien distinctes : les pépins (environ 3% du poids du fruit) qui contiennent eux-mêmes 20% d'huile, le jus (environ 30% du poids du fruit) et la peau qui comprend également les membranes intérieures **[2].**

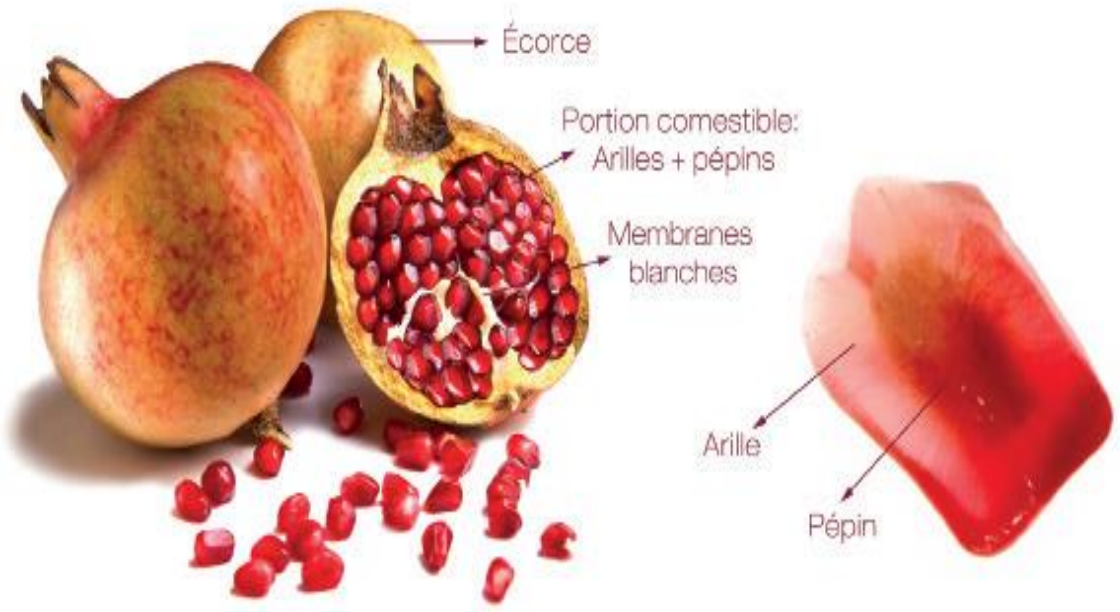


Figure I.1 : Fruit de grenade et ses différentes parties **[12]**

I.1.2. Composition des différentes parties de grenade

D'une manière générale, la composition de la partie comestible de la grenade est bien décrite. En ce qui concerne la peau du fruit et les pépins, seules certaines classes de molécules ont été relativement bien étudiées. Chacun de ses compartiments possède des constituants spécifiques (Figure I.2) dont les teneurs dépendent de la variété, la saison, le stade de maturité, ainsi que du lieu géographique et des conditions de culture [**13**,**14, 15,16,17]**.

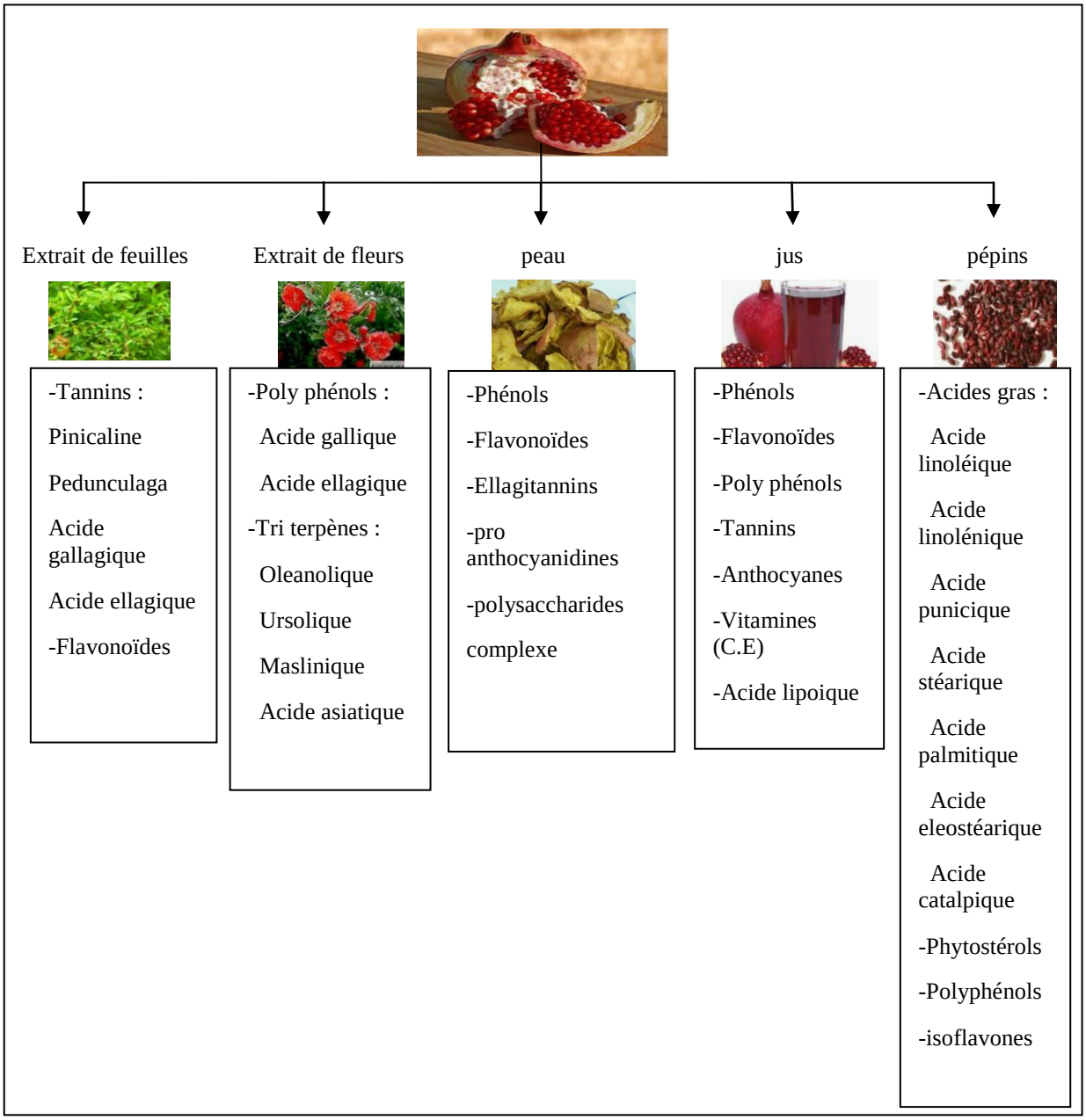


Figure I.2 : Principaux constituants des différentes parties de la grenade ou de leur extrait **[18]**

I.1.3. Valeurs nutritives de grenade

La partie comestible de la grenade représente environ 50% du poids total d'une grenade dont 80% sont les arilles (partie charnue) et 20% les pépins (partie ligneuse).

La composition des graines de grenade est la suivante : eau (85%) ; sucres (10%), principalement fructose et glucose ; acides organiques (1,5%) essentiellement acide ascorbique, citrique et malique ; composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes (essentiellement les anthocyanines).

En outre, les graines de grenade sont une source importante de lipide, car les pépins ont une teneur en acide gras qui oscille entre 12 et 20 % de leur poids total (poids sec). **[12]**

Le tableau I.2 donne la composition nutritionnelle de la partie comestible de grenade.

Tableau I.2: Composition nutritionnelle de la partie comestible **[19]**

Eau : 79à80%	Matières azotées : 1,2%	Matières hydrocarbonées :16%	
Fibres : 3à 3,5 g	Valeur énergétique : 52à60kcal		
Protéines : 1g	Lipides : 0,5g	Glucides : 13%	
Sels minéraux & oligo-éléments			
Potassium : 250mg	Phosphore : 22mg	Calcium : 11mg	Magnésium : 5mg
Sodium : 5mg	Fer : 1mg	Zinc : 200µg	Cuivre : 100µg
Manganèse : 100%			
Vitamines			
Vitamine C : 20mg	Vitamine B1 :30µg Vitamine B6 :µg	Vitamine B2 :20µg	B3/PP/Niacine : 20µg
Vitamine B5 :50µg			
Vitamine A : 30µg			

I.1.4. Propriétés pharmacologiques de grenade

Toutes les parties du fruit du grenadier semblent avoir des propriétés thérapeutiques. Certaines études rapportent que l'écorce, les racines, les feuilles, les fleurs et le tronc ont des effets médicinaux bénéfiques sur certaines pathologies (Tableau I.3).

Tableau I.3 : Propriétés pharmacologiques des différentes parties du grenadier

Partie de la plante	Activité / effet	Résultats de l'étude	Références
Ecorces	Activité antimicrobienne	L'écorce du fruit de *Punicagranatum* possède donc, *in vitro*, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, expliquent probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes.	**[20]**
Graines et écorces	Activité Antidiabétique	L'extrait des graines et d'écorces a montré une réduction de l'augmentation de la glycémie induite par l'alloxane. L'extrait d'écorce a présenté une activité significativement meilleure que l'extrait de graines.	[**21**]
Ecorces	Protection contre la néphrotoxicité	L'administration d'écorce de fruits a montré une amélioration notable des anomalies liées à la néphrotoxicité.	[**22**]
Jus et graines	Activité antioxydante	Des études *in vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert ou du vin rouge enpiégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux.	**[23]**

Ecorce	Activité anti-inflammatoire	L'extrait de fruits de grenadier riche en polyphénols a montré son action inhibitrice de la production induite par la cytokine inflammatoire IL-1β de PGE2 et la production de NO dans les chondrocytes, cet effet inhibiteur c'est élargi sur l'activité enzymatique à la fois de COX-1 et COX-2 in vitro, mais l'effet a été plus prononcé sur l'activité enzymatique de l'enzyme COX-2.	**[24]**
Ecorce	Activité antiseptiques	l'efficacité de l'extrait éthanoïque de l'écorce de grenade dans le traitement des plaies infectées par des champignons chez les lapins, prouvant la propriété antiseptique de l'écorce de grenade. Egalement, l'extrait iso flavonoïdes de l'écorce de grenade peut avoir un effet significatif sur l'amélioration des paramètres reproductifs chez les males des lapins.	**[25]**
Ecorce	Activité antifongique	un pouvoir inhibiteur considérablement élevé a été attribué à l'extrait éthanolique de l'écorce de grenade contre l'ascocyhta rabiei (pass) labr. et fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici.	**[26]**
Jus	Activité anti-HIV	Le jus de grenade contient plusieurs ingrédients, comme l'acide caféique acide ursolique, catéchines et quercétine qui ont été déclarés avoir une activité anti-VIH (pouvoir inhibiteur de gp120-cd4).	**[27]**

Ecorce	Activité anti diarrhéique	L'extrait aqueux de l'écorce de la grenade est riche en tanins, flavonoïdes et alcaloïdes.il présente une activité contre la diarrhée, ce résultat a validé l'ancienne utilisation de l'écorce de grenade comme un anti diarrhéique naturel.	**[25]**
Ecorce; jus et pépins	Activité anticancéreux	L'acide ellagique, l'acide caféique, la luteoline et l'acide punicique, sont tous des composés avec des actions anticancéreuses connues. Le jus fermenté, l'écorce de grenade, et l'huile de pépins de grenade, lorsqu'ils sont combinés, cet ensemble Inhibe la prolifération, l'invasion et la sécrétion de phospholipase A2 (sPLA2) dans le cancer de la prostate.	**[28]**

I.1.5. Autres usages de grenade

Les extraits du fruit grenade ont été utilisés pour préparer des teintures et l'extrait des feuilles a été utilisé pour préparer dans les temps anciens de l'encre **[29]**.Une étude récente reporte que la pelure de grenade a montré un pouvoir remarquable pour l'adsorption de quelques colorants **[30]**.Et dans une nouvelle étude, les chercheurs suggèrent que des films de chitosane préparés par ajout d'extrait d'écorce de grenade et de menthe peuvent être utilisés pour le développement de matériaux d'emballage des aliments actifs **[31]**.

I.2.Daphné Garou

I.2.1. Description de Daphné Garou

I.2.1.1. Origine

Le *Daphnegnidium L* (DGL) est originaire de la péninsule ibérique, la France, la péninsule des Apennins, la péninsule des Balkans les îles Canaries et l'Afrique du Nord **[32]**.C'est un arbuste des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques ; il existe dans tout le Tell de l'Algérie **[33]**.

I.2.1.2. Noms vernaculaires

Les noms de DGL sont donnés comme suit **[32]** :

Nom arabe : Lazzaz

Noms français : Garou, Daphné Garou, Thymèle, Saint Bois

Nom anglais : Flax-leaved (SpurgeFlax) Daphné

Nom scientifique : *Daphnegnidium L.*

I.2.1.3.Classification

La classification de DGL est décrite dans le tableau I.4 **[32,34,35]**

Tableau I.4 : classification de daphné garou

Règne	Plantes
Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	*Thymelaeaceae*
Genre	*Daphné*
Espèce	*Daphnegnidium L*

I.2.1.4. Représentation

Le DGL est une plante appartenant à la famille des Thymeleaceade 60 cm à 2 m de haut ou plus, à feuilles persistantes ou caduques à rameaux minces très feuillés, lisses, cylindriques, pubérulents au sommet. Les feuilles se trouvent sur toute la longueur de la tige, larges de 5-7 mm au plus, cuspides, très denses. Les fleurs blanches petites et tubulaires, poilues sur le calice, souvent odorantes sont groupées en panicules terminales. Le fruit est une drupe ovoïde, rouge orangé. La floraison va d'octobre à mars, c'est une plante entomogame **[33]**.

La figure I.3 représente la plante de Daphné garou.



Figure I.3 : Plante de Daphné garou

I.2.2.Composition et propriétés biologiques

Le DGL contient des coumarines (Daphnétine, daphnine, acétylimbelliférone, daphnorétine) et des flavonoïdes (lutéolin-3′,7-di-*O*-glucoside lutéoline, orientine, isoorientine, quercétine, apigénine-7-*O*-glucoside, genkwanine, 5-*O*-b-D-primeverosyl genkwanine, 2, 5, 7,4'-tétrahydroxyisoflavanol). Les graines et les écorces des différentes espèces du *Daphné*, renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézéréine graines **[33,36,37,38]**.

La composition d'une même espèce peut varier selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée, etc.…

Les propriétés peuvent varier également, d'où la nécessité de travailler dans les mêmes conditions, pour avoir la reproductibilité des résultats à l'étape d'analyse et d'identification des molécules que contient une huile ou un extrait **[39]**.

I.2.3. Propriétés pharmacologiques de daphné garou

Les propriétés thérapeutiques de DGL sont résumées dans le Tableau I.5.

Tableau I.5 : Propriétés pharmacologiques des différentes parties du DGL

Partie de la plante	Activité / effet	Résultats de l'étude	Références
Tiges	L'activité antimicrobienne	L'activité antimicrobienne des tiges du DGL a été évaluée par Cottigli et *al.* , qui ont testé l'extrait méthanolique des tiges sur des bactéries et des champignons. L'extrait a présenté une activité antibactérienne contre le *Bacillus lentus* et l'*Escherichia coli* mais il été inactif contre les champignons. Les flavonoïdes et les coumarines extraits de la plante, ont aussi été testés pour leur pouvoir antibactérien, la daphnétine, la genkwanine et la 2, 5, 7,4'-tétrahydroxyisoflavonol étaient les plus actifs	**[40]**
Feuilles	L'activité antileucémique	L'étude de l'activité antileucémique *in vitro*, des extraits de feuilles du DGL contre les cellules K562 / R7, sensibles et multi résistantes aux médicaments, a révélé que cette plante peut être utilisée avec succès à cet effet.	**[41]**
Feuilles	Effets antioxydants et antigenotoxiques	Des études ont évalué les effets antioxydants et antigenotoxiques des polyphénols, surtout les flavonoïdes du DGL. l'inhibition des réactions prophylactiques des macrophages et de la prolifération des lymphocytes, *in vitro*, par l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du DGL a été évaluée.	**[42,43]**

Feuilles	Activité anti-inflammatoire	L'extrait de feuilles de DGL, à une concentration de 100µg/ml, a démontré une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de la prolifération des macrophages et des lymphocytes, in vitro. Cette Activité anti-inflammatoire a été examinée en mesurant la sécrétion des molécules pro-inflammatoires : l'Il-1β, NO et TNF-α.	**[43]**
feuilles	Activité antifongique	La concentration de 10 µg/ml, l'extrait de feuilles de DGL exerce une inhibition de 94% sur la synthèse de l'aflatoxine B1 *d'Aspergillus flavus*	**[44]**
Parties aériennes	L'activité anti-HIV	L'étude de l'activité anti-HIV de l'extrait du dichlorométhane des parties aériennes du DGL. a montré que ce dernier a un pouvoir antirétroviral important avec absence de cytotoxicité. Quatre dérivés du daphnane, à savoir, la daphnétoxine, la gnidicine, la gniditrine et l'excoécariatoxine, ont manifesté une bonne activité antivirale. Les résultats de cette étude, ont montré que ces composés étaient actifs contre des virus résistants à plusieurs médicaments.	**[45]**
Racines et feuilles	Activité anticancéreux	L'extrait d'acétate d'éthyle des racines de DGL exerce un effet apoptotique et antiprolifératif sur les cellules du cancer du poumon et de l'hépatome *in vitro.* De plus, l'évaluation de l'activité anticancéreuse des extraits de feuilles de DGL a laissé voir une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires de mélanome (B16 FO et B16 F10). A une concentration de 100µg/ml	**[46]**

I.2.4. Autres usages de daphné garou

Anciennement, l'écorce des plantes du genre *Daphne* et plus particulièrement du DGL était utilisée sous forme de pommade aux propriétés épispastiques **[39]**. En phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies et des lésions. Dans la pharmacopée traditionnelle, le DGL était utilisé pour ses propriétés antiseptique, insecticide, dépurative, cicatrisante, sudorifique et abortive. Les feuilles du DGL ont été utilisées dans la teinture de tissus traditionnels **[47].**

Chapitre II

Polyphénols et leurs méthodes d'extraction

II.1. Polyphénols

II.1. 1.Généralités

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvé dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiée **[48]**.Allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins **[49]**. Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences).

Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) **[50]**.

II.1.2. Rôle des polyph1énols chez les plantes

Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes sont impliqués dans un certain nombre de fonctions **[51]**:

- ✓ Ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graine.
- ✓ Représentent un système de défense contre les organismes micro pathogènes,
- ✓ Protègent les plantes contre les radiations UV en absorbant à la fois ces radiations et les espèces réactives de l'oxygène formées.
- ✓ Interviendraient dans la fertilité des plantes et la germination du pollen.

II.1.3. Propriétés chimiques des polyphénols

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques. Ceux-ci sont généralement des noyaux riches en électrons, à cause des effets donneurs des groupements hydroxyles. Les propriétés chimiques qui en découlent sont diverses et variées : réaction de Pechman (formation d'une coumarine), réaction de Mannich (Formation d'amine), …etc **[52].**

II.1.4. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergique , anti-artherogenique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatoire **[53,54]**.Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes. **[55]**

II.1.4.1. Activité antibactérienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéo-muqueux **[56]**. Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire **[57]**.

II.1.4.2. Activité antioxydante

Un antioxydant est une substance qui retarde ou empêche l'oxydation d'un substrat oxydable agissant avec des concentrations faibles **[58]**.Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels que les vitamines et polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation **[59]**. Les antioxydants agissent de différentes manières **[60]**:

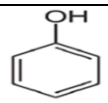
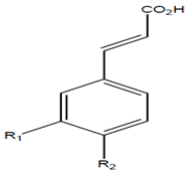
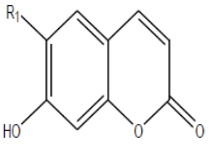
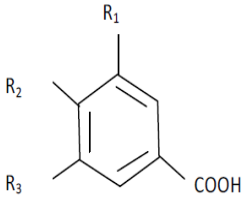
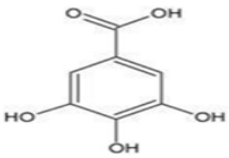
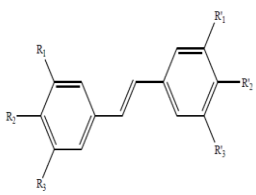
- Ils peuvent empêcher la formation directe des radicaux libres.
- Ils peuvent faire la liaison avec les radicaux libres et les détruire.
- Renforcer le système immunitaire de défense.
- Réparer les dommages résultants de radicaux libres.

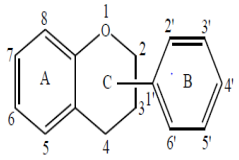
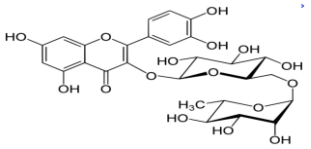
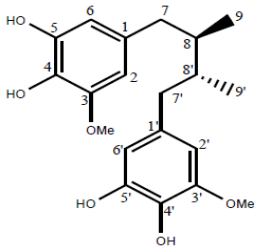
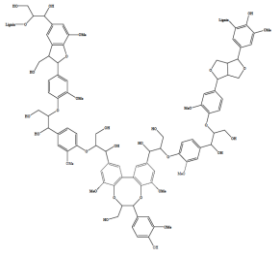
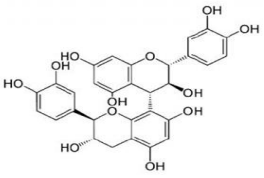
Les méthodes retenues pour l'évaluation de l'activité antioxydante sont nombreuses dont la mesure du pouvoir réducteur et du pouvoir chélateur des métaux **[61]**.

II.1.5. Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : Les non flavonoïdes dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines les coumarines et les tanins **[62]** et les flavonoïdes**,** dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols **[63]**. Le Tableau II.1 représente les principales classes des composés phénoliques, où les symboles R_i représentent des radicaux alkyles.

Tableau II.1 : Principales classes des composés phénoliques **[64]**.

Squelette Carboné	**Classe**	**Exemple**	**Origine (exemple)**
C6 	Phénols simple	Catéchol	
C6-C3	Acides hydroxycinnamique 	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre Pomme
	Coumarines 	Scopolétine, esculétine	Citrus
C6-C3 	Acides hydroxybenzoïques	Acide gallique 	Ecorce de grenade
C6-C2-C6 	Silènes	Resvératrol	Vigne

	Flavonoïdes -Flavonols -Anthocyanes -Flavonals -Flavanones -isoflavonols	Rutine  Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatéchine Naringénine daidzéine	Fruits,légumes, fleurs Fleurs, Fruits rouges Pomme, raisin Citrus soja
(C6-C3)2 	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) n 	Lignines		Bois, noyau de fruits
(C15)n	Tanins	Tanins *condensés*  Tanins hydrolysables	Raisin rouge, Kaki

II.1.6. Principaux composés phénoliques présents dans les biomasses étudiées

Les fruits de la grenade sont une source de divers composés biologiquement actifs, tels que les composés phénoliques comme punicalagine, acide ellagique, gallotannins, anthocyanines, qui sont connus en tant qu'antioxydants **[65]**. De plus le Daphné garou noté DGL est également riche en coumarine et flavonoïde. Dans ce qui suit nous allons présenter les polyphénols les plus représentatifs de ses deux biomasses.

II.1.6.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux **[65]**.

Les principaux flavonoïdes présents dans la grenade sont la catéchine quercitrine, et la kæmpferia, qui jouent un rôle important dans l'activité antioxydante **[65]**.

Les flavonoïdes tels que, la quercétine, l'isoorientine, la lutéoline7-*O*- glucoside, l'apigénine 7-*O*-glucoside et la 5-*O*-β-D-primeverosylgenkwanine, ont été aussi isolées du *Daphne gnidium L* **[66 ,67, 36,37].**

II.1.6.2. Anthocyanes

Les anthocyanes (en grec Anthos signifie fleur, et kyanos signifie bleu) sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces **[68]**. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylium.

Ils sont accumulés dans les vacuoles cellulaires **[69]** et ils sont responsable des couleurs rouges, violettes et bleues dans les fruits, les légumes, les fleurs et les graines, mais aussi jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes et dans la dispersion des graines **[70]**.

Donc la composition en anthocyanines est un paramètre important de qualité du fruit de la grenade, en raison de l'importance de ces derniers dans la couleur des jus respectifs. Les anthocyanines dans la grenade changent considérablement avec les cultivars, la maturité, le secteur de production et les conditions saisonnières **[65].** Les anthocyanes sont stabilisés dans les plantes par des interactions avec des acides aminés, des tanins, des 4-oxo-flavonoïdes. La figure II.1 illustre deux exemples des structures chimiques des anthocyanes **[71**].

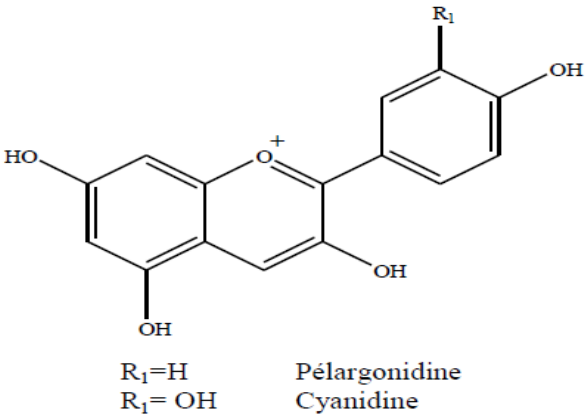


Figure II.1: Exemples des structures chimiques des anthocyanes

II.1.6.3. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau **[72]**. Les tannins confèrent un goût amer au jus de la grenade et aux membranes blanches qui entourent les graines. Il a été rapporté que la grenade possède deux tannins à savoir l'acide ellagique et punicalagine qui ont un rôle important dans l'activité antioxydante. Les tanins se subdivise en deux types **[65].**

- Tanins hydrolysables
- Tannins condensés

II.1.6.4. Coumarines

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. Elles sont considérées comme des phytoalexines. Celles-ci sont des molécules de faible masse moléculaire provenant de voies métaboliques variées comme celle des phényl propanoïdes ou des sesquiterpènes **[73]**.

Le *Daphnegnidium L* contient d'autres coumarines simples ; la daphnin et l'acetylumbelliferone **[37]**.

II.1.6.5. Saponines

Les saponines ou saponosides sont une classe spécifique de métabolites secondaires, produits naturels retrouvés abondamment dans le règne végétal **[74]**.Ce sont des substances tensioactives, glycosides. Ils sont principalement produits par les plantes supérieures, mais aussi par des animaux marins inférieurs et quelques bactéries **[75,76]** qui sont souvent utilisés pour consommation humaine et animale **[77]**.

Le nom saponine dérive du mot latin « sapo », qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou à plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de triterpène. Ainsi on distingue fondamentalement, les saponines stéroïdiques et les saponines striterpéniques (Figure II.2) dérivant tous deux, bio synthétiquement de l'oxydosqualène.Ils manifestent des propriétés hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, molluscicidales), anti-inflammatoires et antalgiques **[78]**.

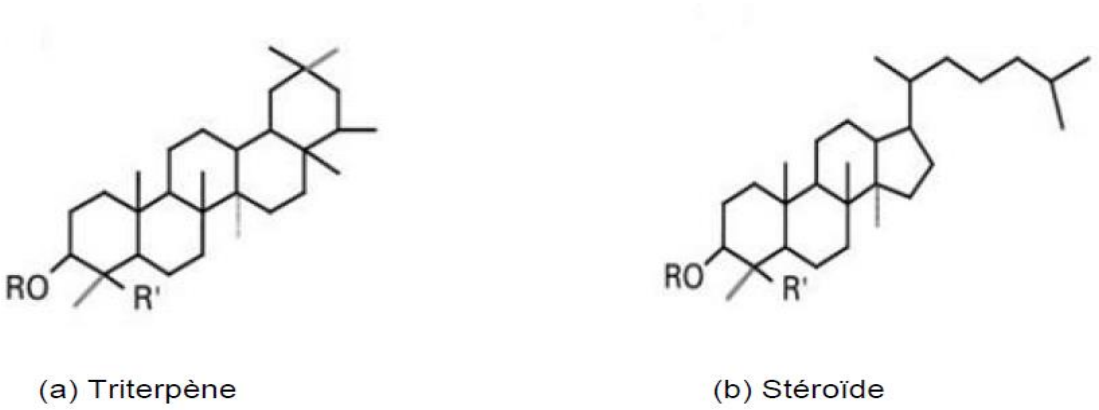


Figure II.2: Structure de base des saponines [**75]**

II.2. Méthodes d'extraction des composés phénoliques

En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature des composés (par exemple, classes des molécules phénoliques spécifiques telles que des flavonoïdes, acides phénoliques, etc.), de la nature de l'échantillon (graines, feuilles, ramilles) et de son état physique. Indépendamment de la technique choisie, l'optimisation des conditions d'extraction peut être changée selon la préparation de l'échantillon **[79]**.

Les méthodes d'extractions nombreuses et sont regroupées en méthodes classiques (macération, soxhlet….) et méthodes alternatives (extraction assistée par ultrasons et par microondes…).

II.2.1.Méthodes classiques

Les techniques classiques pour l'extraction par solvants de molécules actives à partir des matrices végétales sont basées sur le choix du solvant couplé à la température et/ou à l'agitation. Les techniques classiques existantes permettant d'extraire ces principes actifs incluent : Soxhlet, l'hydrodistillation et la macération avec un mélange alcool-eau ou une graisse chaude **[80]**.

II.2.1.1. Macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction. La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint **[81]**.

II.2.1.2. Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Le Soxhlet est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt **[82]**. La figure II.3 illustre un extracteur de Soxhlet.

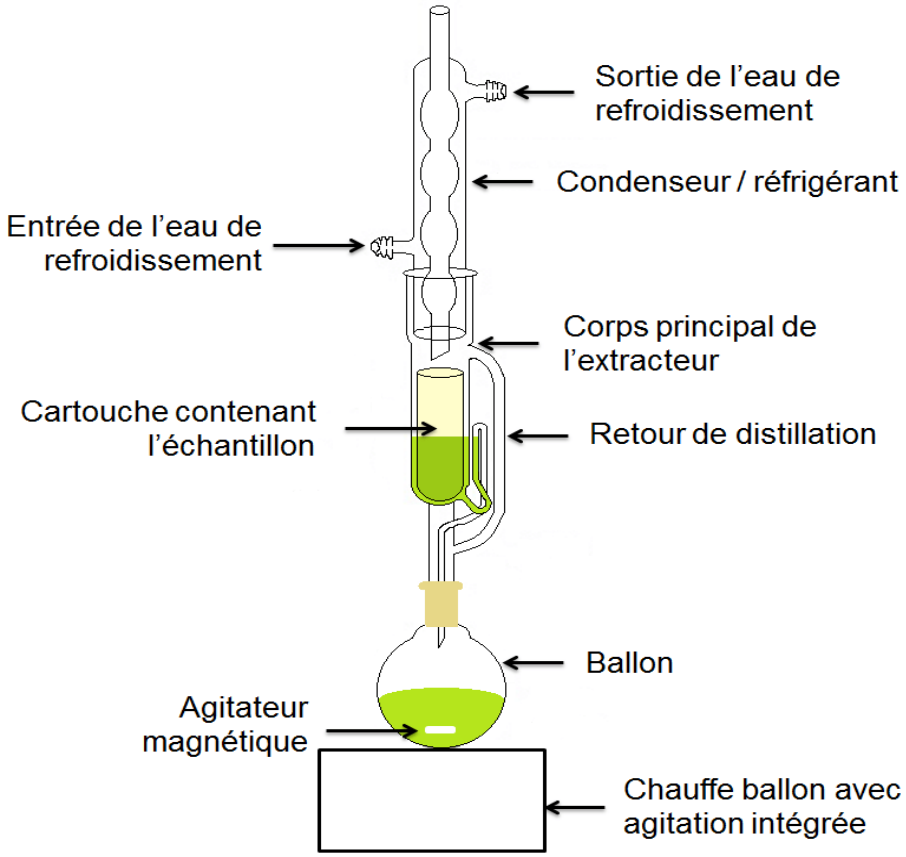


Figure II.3: Extracteur de Soxhlet

II.2.2. Méthodes alternatives

L'extraction de molécules issues du matériel végétal ou ligneux par les techniques conventionnelles se révèle être une étape souvent délicate et très longue qui nécessite une consommation importante de solvant. Cela a pour conséquence d'engendrer des dégradations des matières traitées (à chaud par exemple) et de diminuer le rendement d'extraction. Une demande croissante de nouvelles techniques d'extraction permettant de réduire à la fois, le temps d'opération, la consommation de solvant et la quantité d'effluents. Les techniques modernes telles que l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par solvant accélérée sont des techniques rapides et efficaces pour extraire des composés chimiques des matrices solides de plantes. Ces techniques peuvent fonctionner à haute température et/ou haute pression améliorant nettement le but de palier la cinétique d'extraction **[83]**.

II.2.2.1. Extraction assistée aux ultrasons

L'extraction par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu couteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Cette technique est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par ultrasons permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels. Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale **[84]**.Le principe de cette procédure est illustré dans la figure II.4.

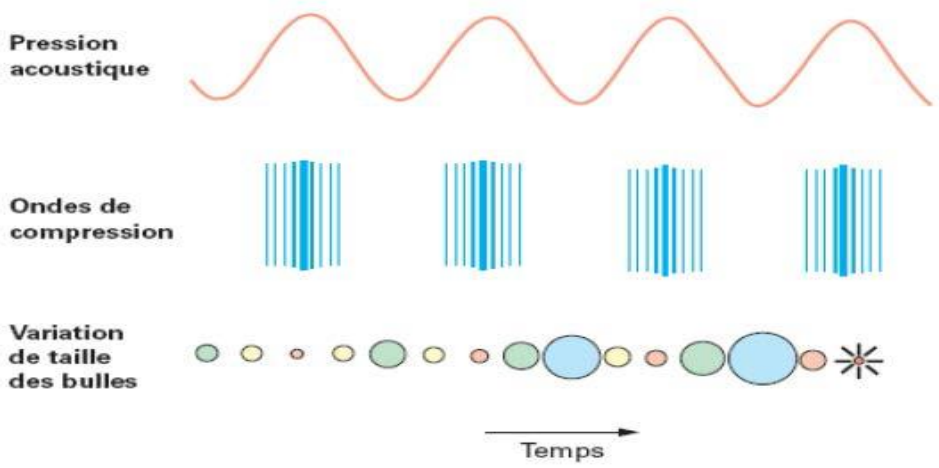


Figure II.4 : Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique **[85]**

L'ultrason fait référence aux ondes sonores qui génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse **[86]**.Ce phénomène est appelé la cavitation acoustique.

II.2.2.2. Extraction assistée par microondes

L'extraction assistée par microondes est un processus par lequel l'énergie microonde accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales **[87,88]**. Le principe de cette procédure est illustré dans la figure II.5.

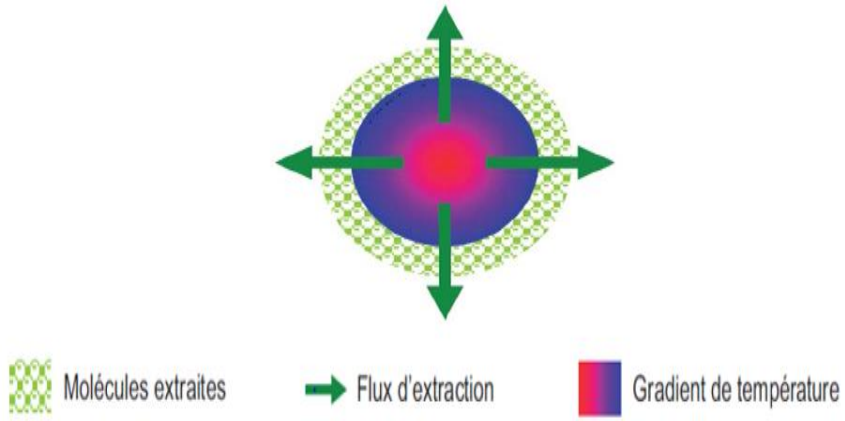


Figure II.5 : Principe de chauffage par microondes **[89]**

Au cours du traitement par microonde, le chauffage provoque la rupture des liaisons hydrogène faibles par la rotation dipolaire des molécules. Une quantité considérable de pression s'accumule à l'intérieur du biomatériau, qui modifie les propriétés physiques des tissus biologiques et améliore la porosité de la matrice biologique. Ceci permet une meilleure pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice **[90,91]** et facilite l'extraction des composés entre autres les composés phénoliques **[92]**.

Elle utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas couteuse et est considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement haute (100 – 150 °C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants. Les autres inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extrait **[83]**.

II.3. Travaux antérieurs sur l'extraction des composés phénoliques à partir de grenade et de daphné garou

Le fruit de grenade ainsi que le daphné garou ont fait l'objet de plusieurs études pour l'extraction des métabolites secondaires. Le tableau II.2 représente quelques travaux réalisés sur ces deux biomasses.

Tableau II.2 : Résumé de quelques travaux effectués sur l'extraction des composés phénoliques à partir des deux biomasses étudiée

Grenade										
Méthode	Partie de grenade	Payé d'origine	Solvant	S/l(g /ml)	T(°C)	t (min)	dp(µm)	TP (mgEAG/100g mp)	R (%)	Référence
EU	Ecorce	Iran	Méthanol	1/50	70	30	250	9365.70	46.9	**[93]**
ES	Graine	Iran	Benzène et Hexane	1/31	35	360	400	780–7210	_	**[94]**
ESC	Ecorce	Chine	Méthanol	1 /15	40	240	400	8.26	46,5	**[95]**
EMO	Ecorce	China	Ethanol (50%)	1/20	_	2	400_ 600	Tf=0,187 (mg EQ /g MS)	2.946	**[96]**
Daphné garou										
ESC	Feuille	Algérie	Méthanol	1 /40	_	1440	_	216.6(mg GAE/g MS) Tf=12.4(mg EC/g MS)	_	**[97]**

Chapitre III
Etude expérimentale

III.1. Introduction

Ce travail, qui a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie de la faculté des sciences de l'université de Médéa, a pour objectif l'extraction des composés phénoliques à partir de deux biomasses végétales récoltées au niveau de la wilaya de Médéa. Il s'agit des écorces de grenade et les feuilles de Daphné Garou.

Une étude phytochimique des espèces végétales passe généralement par la récolte de la plante et sa conservation, ensuite la matière végétale est broyée et/ou préparée pour l'extraction. Enfin, le matériau est prêt pour la caractérisation par l'analyse des extraits.

Pour ce faire, notre partie expérimentale est structurée comme suit :

- Préparation et caractérisation des biomasses végétales ;
- Extraction des composés phénoliques ;
- Caractérisation physicochimique des extraits obtenus ;
- Etude des activités antioxydante et antibactérienne.

III.2. Matériels et produits

Les matériels et les produits utilisés au cours de ce travail, sont regroupés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Matériels et produits utilisés

Matériels et appareils	**Produits**
- Plaque chauffante et barreau magnétique - Centrifugeuse type Hettich ba21 - Etuve -Spectrophotomètre Uv-vis Cintra 303 Shimadzu GBC V4074 - Tensiomètre Du Nouy - pH- mètre (Selecta P) - Conductimètre (Selecta P) - Tamiseur (Controlab) - Bain-marie thermostaté - Vortex	- Ethanol Sigma-Aldrich (pureté ≥99%) - Eau distillée- Folin-Ciocalteu (diluée 10 fois) - Bicarbonate de sodium Na_2CO_3 -Rutine hydraté Sigma (pureté ≥94%) - Chlorure d'aluminium $ALCL_3$ - Acide gallique Sigma (97.5-102.5%) - Eau physiologie - Milieu de culture Mueller- Hinton -DPPH Sigma (0,5%)

III.3. Matériel végétal

Notre étude expérimentale porte sur l'utilisation de deux espèces végétales à savoir : le grenade (*Punica granatum* L) et : le Daphné Garou (*Daphne gnidium L*) (Figure III.1).



Punica granatum *Daphne gnidium L*

Figure III.1 : Plantes utilisées dans cette étude

III.3.1. Récolte de la matière végétale

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est :

- Les écorces de grenade : ces dernières ont été obtenus à partir des fruits de grenade récoltés en moins d'octobre de deux régions de la wilaya de Médéa : Baata (PGL1) et Ben Chicao (PGL2).
- Les feuilles de Daphné garou : ces dernières ont été récoltées en moins de Janvier dans la région de Ben chicao (Wilaya de Médéa). Cette biomasse est notée DGL.

III.3.2. Préparation et caractérisation de la matière végétale

A.Séchage de la matière végétale

Les écorces de grenade ainsi que les feuilles de daphné garou ont été séchées à l'air libre, ensuite conservées dans des sacs en plastiques dans des endroits secs jusqu'à utilisation. Les parties des plantes conservées ont été lavées avec l'eau de robinet ensuite l'eau distillée. Le matériau végétal lavé est étuvé à 40 °C jusqu'à ce que son poids soit constant (Figure III.2).

Il est à noter que cette étape de séchage, nous a permis d'évaluer le taux d'humidité des matières végétales utilisées.

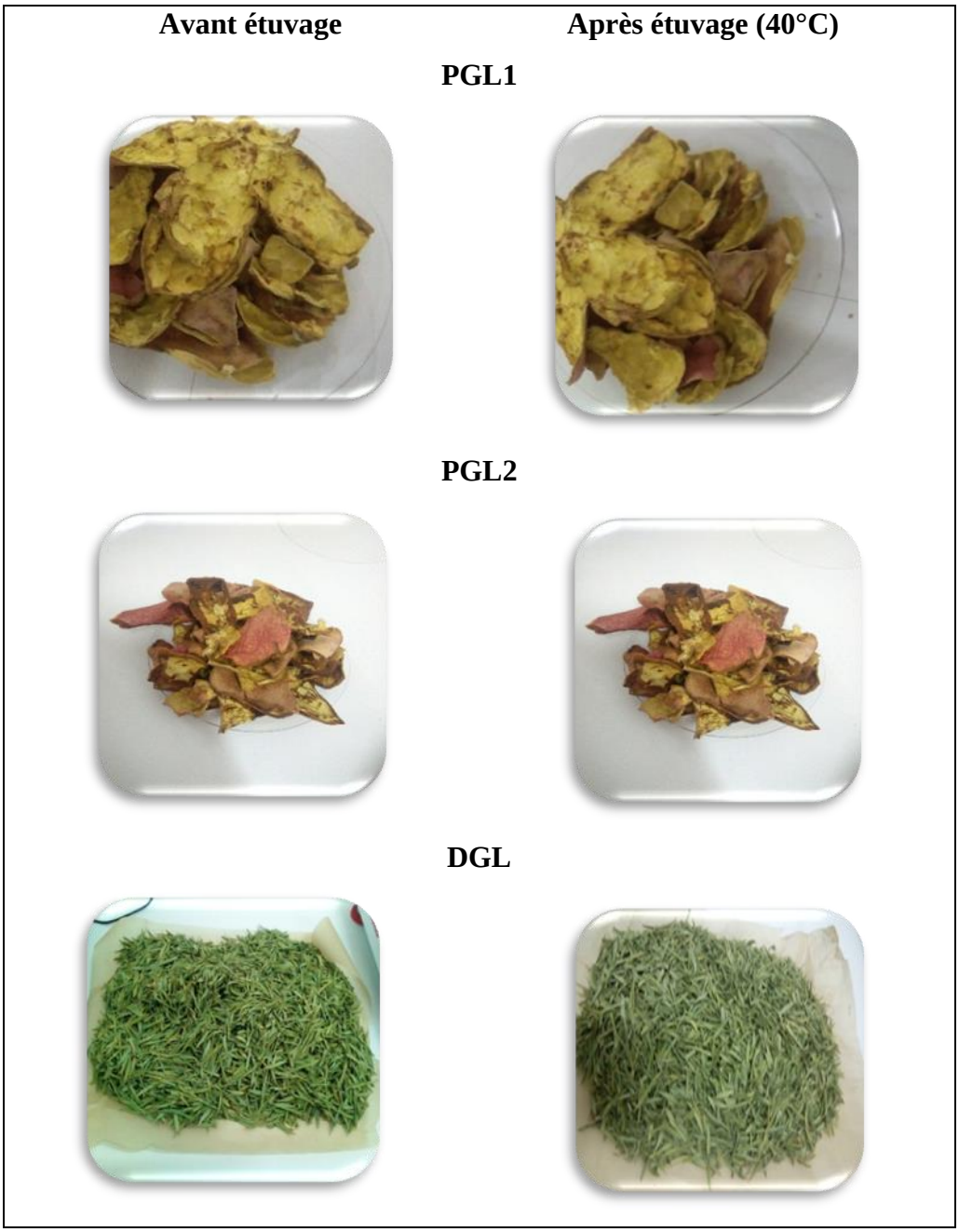


Figure III.2: Matière végétale séchée

- **Détermination de la teneur en humidité**

Le taux d'humidité des biomasses utilisées a été déterminée par la formule suivante **[98]** :

$$\text{Taux d'humidité} = \frac{m0 - m1}{m1} \times 100 \qquad \textbf{(III.1)}$$

Avec :

m_0 : masse de la poudre avant l'étuvage.

m_1 : masse de la poudre après l'étuvage.

Les résultats des mesures du taux d'humidité des trois matières végétales étudiées sont donnés dans le tableau III.2.

Tableau III.2: Résultats du taux d'humidité des biomasses étudiées

Matière végétale	PGL1	PGL2	DGL
Taux d'humidité (%)	20.96	26.51	7.038

Selon ces résultats, nous constatons que les écorces des deux variétés de grenade ainsi les feuilles de daphné garou sont moyennement humides. Donc on peut dire que l'étape de séchage qui a été adoptée dans cette étude nous a aidé pour faciliter le broyage et la conservation de ces poudres jusqu'à leur utilisation.

B. Broyage et tamisage du matériel végétal

Après séchage, les matières végétales utilisées ont été broyées dans un mortier en porcelaine (Figure III. 3). Par la suite, les différentes poudres obtenues ont été tamisées pour déterminer leur granulométrie.

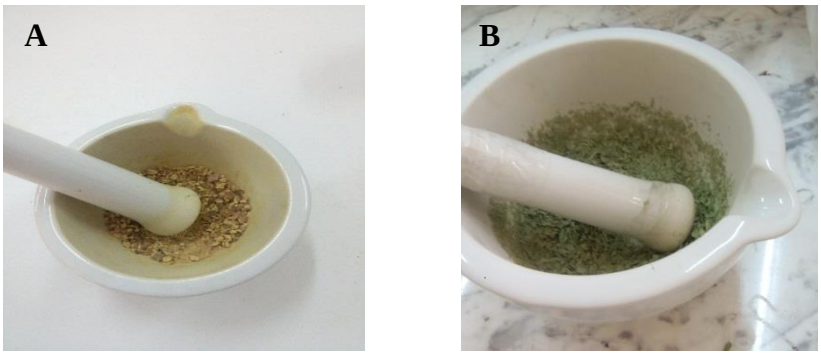


Figure III.3: Broyage de la matière végétale : **A** : PGL, **B** : DGL

- **Caractéristiques organoleptiques**

Les caractéristiques organoleptiques de la poudre qui ont été observées sont : l'odeur et la couleur de la poudre. Les principaux résultats sont illustrés dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Caractéristiques organoleptiques des poudres des biomasses étudiées

Poudre	Odeur	Couleur
 **PGL1**	Faible	Jaune foncée
PGL2 	Faible	Jaune orange
DGL 	Forte	Verte

La méthode de tamisage selon la norme AFNOR X 31-107 AFNOR, 1994 consiste à classer les différentes poudres d'un échantillon solide en utilisant une série de tamis ou passoire (Figure III.4), emboîtés les uns sur les autres, dont les ouvertures sont décroissantes du haut vers le bas. L'échantillon étant placé au sommet, la pile de tamis est vibrée. La poudre restante dans chaque tamis **(refus)** est pesée puis convertie en % **[99]**.



Figure III.4 : Série de tamis

- **Détermination du diamètre moyen des broyats**

Le diamètre moyen des broyats de l'écorce de grenade et des feuilles de daphné garou a été déterminé selon la méthode AFNOR X31-107 (AFNOR, 1994). Toutes les poudres ont été fractionnées en trois lots de diamètres différents.

Les résultats de tamisage effectué sur les poudres des biomasses étudiées sont donnés sur la figure III.5 (a, b et c).

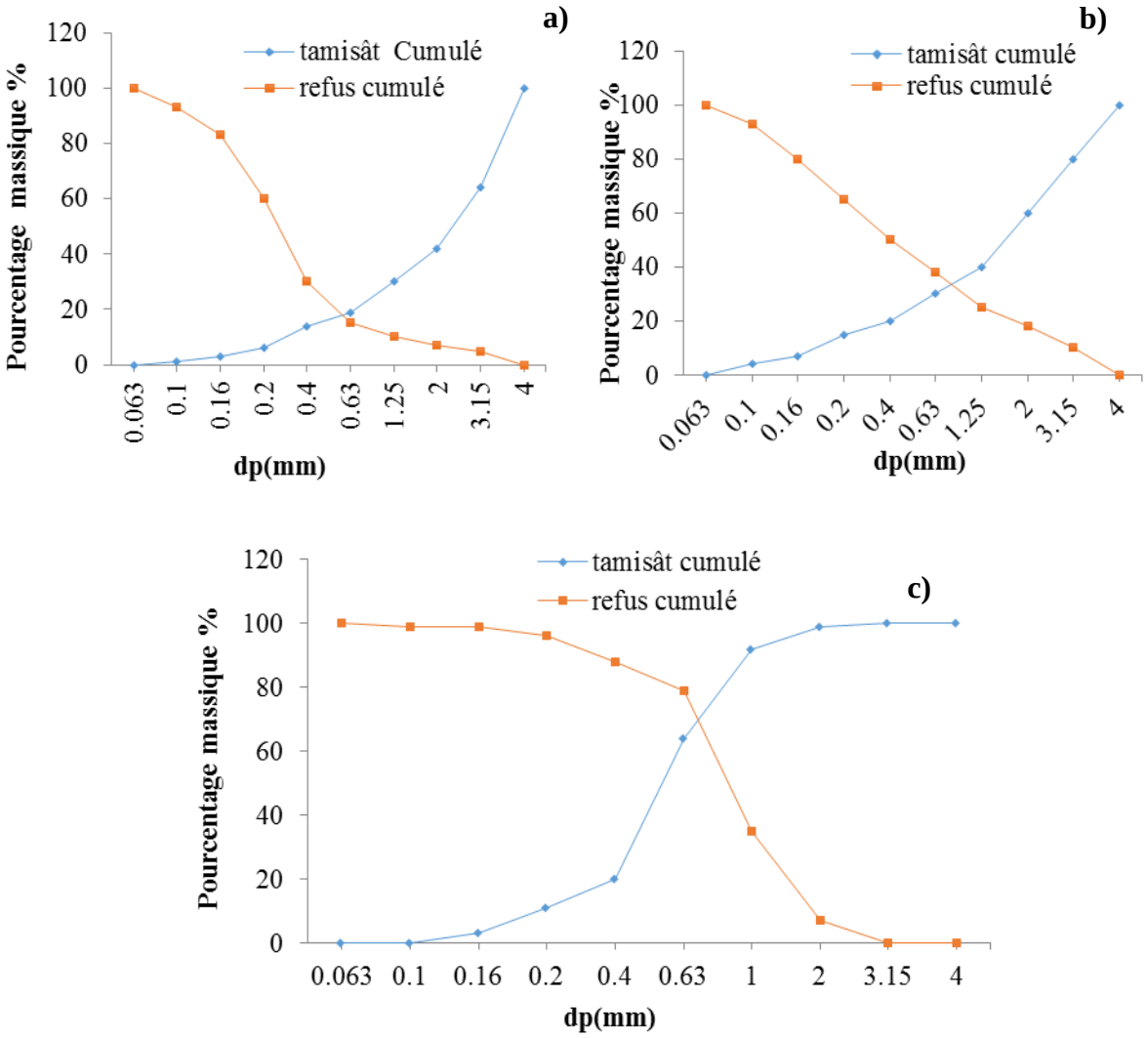


Figure III.5: Diamètre moyen de la poudre

a) PGL1 b) PGL2 c) DGL

L'analyse de ces trois figures montre que, le diamètre moyen (dp) des poudres obtenues après broyage est de 0.63mm.

III.4. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques à partir des trois biomasses choisies est une extraction de type solide-liquide qui repose sur le principe de solubilité des polyphénols dans les solvants d'extraction. Le choix du solvant dépend de la nature des composés à extraire et de leur solubilité dans le solvant choisi.

En plus de la nature du solvant, l'extraction des polyphénols est influencée également par d'autres paramètres qui sont : pH, température, le rapport pondéral : matière végétal/solvant et la taille ou la forme de la matière végétale.

Donc, dans cette étude, et dans l'optique d'éviter les essais préliminaires pour choisir les conditions optimales d'extraction des polyphénols, nous avons procédé à l'extraction des polyphénols à partir des trois biomasses par une macération en adoptant la méthodologie des plans d'expérience. Le logiciel de plan d'expérience utilisé est le MODDE 6.

III.4.1. Mise au point du domaine expérimental

La méthode des plans d'expériences permet de montrer comment une variable ou réponse Y (rendement, composition, ...) est influencée par un certain nombre de variables d'entrée X (pH, température, ...) en minimisant le nombre d'expériences à réaliser. Cette approche statistique permet en outre de quantifier les effets des différentes variables d'entrée sur les différentes variables de sortie ou réponses.

Les facteurs d'entrée étudiés avec leurs bornes (niveau inférieur et niveau supérieur) sont donnés dans le Tableau III.4. Il est à noter que les bornes du domaine de chaque facteur étudié ont été définies suite à des recherches antérieures **[93, 95,96]**.

Tableau III.4. Définition des facteurs et leurs niveaux

Facteur	Niveau inférieur	Niveau centre	Niveau supérieur
Température T(°C)	40	55	70
Temps t(h)	2	3	4
Rapport S/L (g/ml)	1/15	1/25	1/35
Nature du solvant (N.S)	0 Eau	0.5 50% éthanol	1 Ethanol
Diamètre des particules: dp (mm)	0.2	0.6	1

Un plan d'expériences factoriel fractionnaire CCF (Composite Centered Face) a été réalisé. Ce plan correspond à 27 expériences au total. L'ensemble de ces expériences sont résumées dans la matrice d'expériences donnée sur le Tableau III.5.

Tableau III.5. Matrice d'expériences

Exp N°	T(°C)	t (h)	Rapport S/L (g/ml)	N.S	dp (mm)
1	40	2	1/35	0	1
2	70	2	1/35	0	0 2
3	40	4	1/35	0	0.2
4	70	4	1/35	0	1
5	40	2	1/15	0	0.2
6	70	2	1/15	0	1
7	40	4	1/15	0	1
8	70	4	1/15	0	0.2
9	40	2	1/35	1	0.2
10	70	2	1/35	1	1
11	40	4	1/35	1	1
12	70	4	1/35	1	0.2
13	40	2	1/15	1	1
14	70	2	1/15	1	0.2
15	40	4	1/15	1	0.2
16	70	4	1/15	1	1
17	40	3	1/25	0.5	0.6
18	70	3	1/25	0.5	0.6
19	55	2	1/25	0.5	0.6
20	55	4	1/25	0.5	0.6
21	55	3	1/35	0.5	0.6
22	55	3	1/15	0.5	0.6
23	55	3	1/25	0	0.6
24	55	3	1/25	1	0.6
25	55	3	1/25	0.5	0.2
26	55	3	1/25	0.5	1
27	55	3	1/25	0.5	0.6

III.4.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental de l'extraction des polyphénols par une macération à chaud en utilisant différents solvants (eau, éthanol et eau/éthanol 50% (volumique) est résumé comme suit :

- ✓ Une masse de biomasse est introduite dans un erlenmeyer ;
- ✓ Un volume du solvant d'extraction est ajouté ;
- ✓ L'ensemble est placé dans un bain marie à une température bien déterminée (voir figure III.6).

- ✓ A la fin de l'extraction, le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre de type Whitman, et le filtrat obtenu est centrifugé à une vitesse 4000 tr/min pendant 15min (voir figure III.7).



Figure III.6 : Macération à chaud à différentes températures

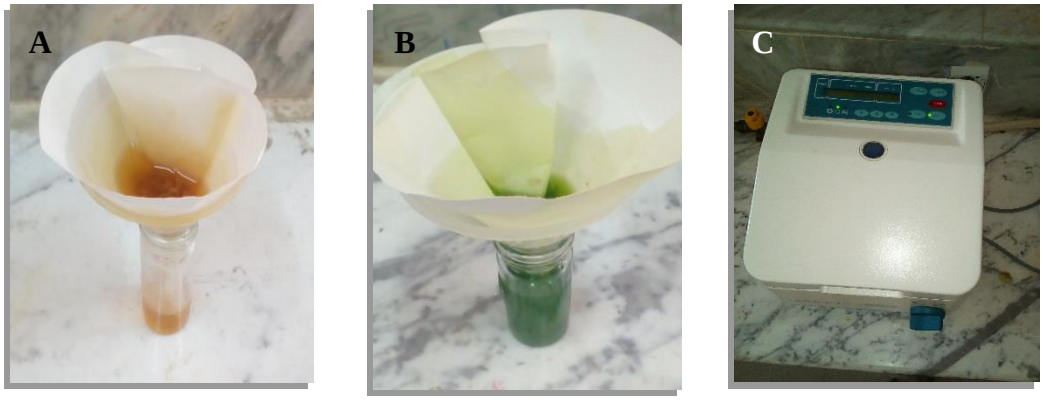


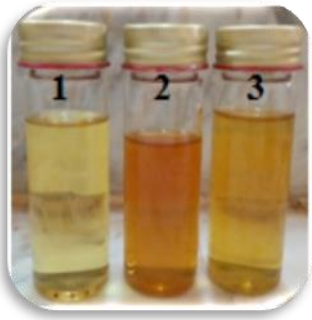
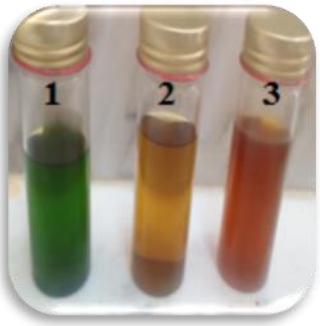
Figure III.7 : Opérations de filtration (A: extrait grenade, B : extrait DGL) et de centrifugation (C)

III.5. Caractérisation des extraits

III.5.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des extraits obtenus pour les trois matières végétales (PGL1, PGL2 et DGL) sont résumées dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Caractéristiques organoleptiques des extraits

	Extrait	Aspect	Odeur	Couleur
PGL1 	(1) Ethanol	Liquide Homogène	Moyenne, caractéristique de l'écorce de grenade.	Jaune clair
	(2) Eau/Ethanol 50%	Liquide Homogène	Moyenne, caractéristique de l'écorce et l'éthanol.	Marron
	(3) Eau	Liquide Homogène	Moyenne, caractéristique de l'écorce et l'éthanol.	Jaune foncé
PGL2 	(1) Ethanol	Liquide Homogène	moyenne, caractéristique de l'écorce de grenade	Jaune clair
	(2) Eau/Ethanol 50%	Liquide Homogène	moyenne, caractéristique de l'écorce et l'éthanol	Marron
	(3) Eau	Liquide Homogène	moyenne, caractéristique de l'écorce et de l'éthanol	Jaune foncé
DGL 	(1) Ethanol	Liquide homogène	moyenne, caractéristique de daphné Garou	Vert foncé
	(2) Eau/Ethanol 50%	Liquide homogène	moyenne, caractéristique de daphné Garou et l'éthanol	Verdâtre
	(3) Eau	Liquide Homogène Visqueux	moyenne, caractéristique de daphné Garou et de l'éthanol	Marron

III.5.2. Mesure de pH

Les résultats relatifs aux mesures des pH des différents extraits obtenus sont illustrés dans le tableau III.7.

Tableau III.7. Résultats des pH

Exp N°	PGL1	PGL2	DGL	Exp N°	PGL1	PGL2	DGL
1	4.31	4.16	6.19	**15**	4.43	4.60	5.90
2	3.89	4.19	6.42	**16**	4.27	3.96	4.90
3	4.19	4.16	5.66	**17**	4.51	4.32	6.44
4	3.79	3.92	6.07	**18**	4.55	4.57	6.14
5	4.33	4.20	6.26	**19**	4.73	4.71	6.41
6	4.30	4.01	6.19	**20**	4.57	4.43	6.22
7	4.10	3.89	6.27	**21**	4.71	4.67	6.60
8	3.96	3.70	6.15	**22**	4.63	4.30	6.61
9	3.80	4.18	5.77	**23**	3.90	3.77	6.20
10	4.55	4.30	5.35	**24**	4.46	3.78	6.31
11	4.39	4.63	5.43	**25**	4.63	4.40	6.61
12	4.32	4.62	5.73	**26**	4.61	4.42	6.53
13	4.24	4.20	6.15	**27**	4.65	4.44	6.70
14	4.27	3.95	6.20	**/**	/	/	/

La variation de pH des extraits des trois plantes étudiées est donnée comme suit :

- **PGL1 :** [3.79-4.92]
- **PGL2 :** [3.7-4.71]
- **DGL :** [4.90-6.90]

Ces résultats montrent que les extraits de grenades ont un caractère acide, alors que ceux de DGL oscillent entre acide faible et la neutralité. Le caractère acide des extraits confirme leurs contenances en composés acides comme l'acide gallique. Cette particularité confère aux extraits de grenade une bonne conservation contre la prolifération des microorganismes.

III.5.3. Conductivité électrique

Les valeurs de la conductivité électrique des différents extraits sont données dans le tableau III.8.

Tableau III.8. Résultats de la conductivité électrique (en µs/cm)

Exp N°	PGL1	PGL2	DGL	Exp N°	PGL1	PGL2	DGL
1	80.4	81	81.6	**15**	96	113	98.1
2	111.3	91.6	100.1	**16**	142	115.4	147
3	81.9	121	114.7	**17**	77.7	77.1	83.8
4	76.3	95	100	**18**	112	105.6	136.7
5	113.7	142	135.2	**19**	80.6	87	76.3
6	114.5	129	146.7	**20**	94	85.4	84.7
7	166	160	134	**21**	83.1	87.7	90.6
8	113	100	109	**22**	124.2	145	132.5
9	119	101	153	**23**	102	120	133.8
10	122	112	169	**24**	92.9	100.4	102.8
11	93.3	98	93	**25**	96.6	109	93
12	100.2	84	93.4	**26**	81.3	90	88
13	90	71	80.4	**27**	121	142	130
14	106.8	120	111.7	/	/	/	/

Les valeurs de conductivités des extraits varient comme suit :

- **PGL1** : [76.3-166] µs/cm
- **PGL2** : [71-145] µs/cm
- **PGL3** : [76.3-169] µs/cm

Ces résultats nous permettent de dire que tous les extraits obtenus sont moyennement riches en espèces ioniques dissoutes d'une manière comparable.

III.6. Analyse quantitative des composés phénoliques

III.6.1. Dosage des polyphénols totaux

III.6.1.1. Principe

La teneur en polyphénols totaux (PPT) des différents extraits est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu qui a été décrite en 1965 par Singleton et Rossi **[100]**. Cette méthode est basée principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique-phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline par les

phénols **[101]**. Elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue qui absorbe à 737 nm. Le dosage des composés phénoliques a été effectué par la spectrophotométrie UV-Visible.

III.6.1.2. Protocol expérimental

Les différentes étapes réalisées pour le dosage des PPT des différents extraits par colorimétrie sont résumées sur la figure III.8. Le blanc utilisé a la même composition en remplaçant 0.2 ml de l'extrait par 0.2 ml d'eau distillée.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (0, 10, 20, 40, 60, 80 µg/ml) préparées à partir d'une solution mère (100 µg/ml) de l'acide gallique **[102]**. Les courbes d'étalonnages d'acide gallique réalisées avec les différents solvants (eau, éthanol 50% et éthanol) sont données dans l'annexe I.

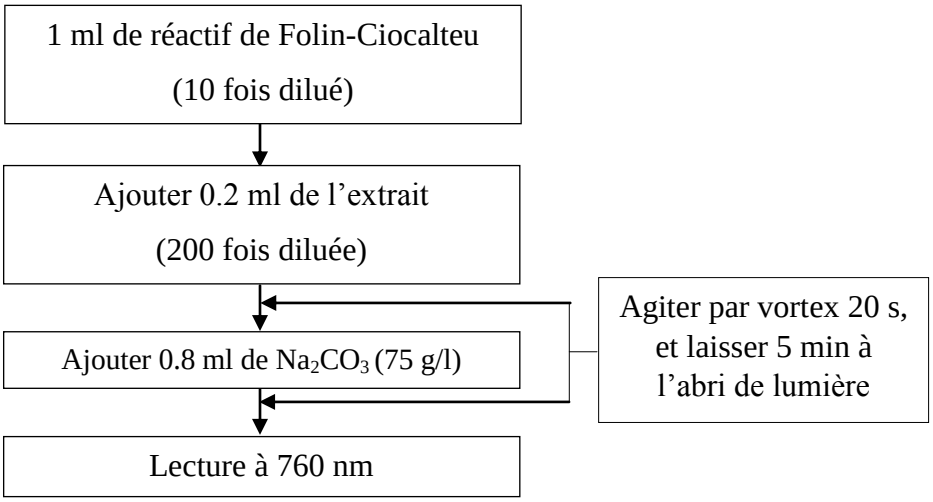


Figure III.8: Dosage des polyphénols totaux

III.6.1.3. Calcul

Les teneurs en PPT sont exprimées en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche selon la formule suivante :

$$TPP = \frac{Vs \times C \times k}{mp} \qquad \textbf{(III.2)}$$

Avec :

TPP : Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g).

Vs : Volume de l'échantillon (ml).

C : Concentration de l'échantillon lue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

k : Facteur de dilution.

m_p : Masse d'échantillon (g).

III.6.1.4. Résultats

Les principaux résultats relatifs au dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits des trois biomasses (PGL1, PGL2 et DGL) sont donnés dans l'annexe III et présentés en termes d'influence des différents paramètres d'extraction : nature du solvant, rapport pondérale, température, temps d'extraction et taille des particules.

A. Effet du solvant

La figure III.9 représente l'effet du solvant sur l'extraction des polyphénols totaux sous les conditions : S/L =1/25 g/ml, T = 55°C, t= 3h et dp= 0.6 mm.

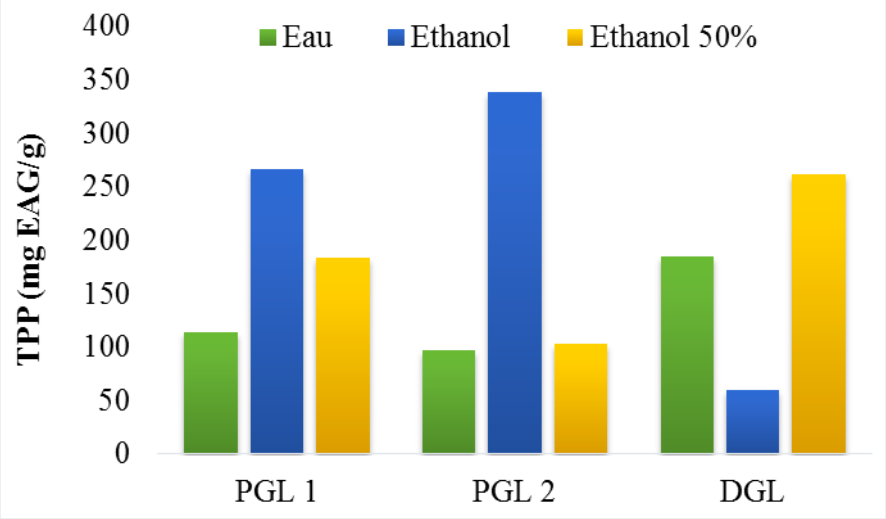


Figure III.9 : Effet des solvants sur l'extraction des polyphénols totaux, S/L =1/25 g/ml, T = 55°C, t= 3h et dp= 0.6 mm

L'analyse de la figure III.9 nous a permis de soulever les points suivants :

- L'éthanol pur représente le meilleur solvant pour l'extraction des PPT à partir des écorces de grenade.
- L'éthanol 50% représente le meilleur solvant pour l'obtention des PPT des feuilles de daphné garou.
- L'extrait le plus riche en PPT est celui de la biomasse PGL2 avec une teneur de 338.58 mg EAG/g.

B. Effet du rapport solide/liquide

L'effet du rapport solide/liquide sur l'efficacité d'extraction des polyphénols totaux avec l'éthanol 50% à 55°C pendant 3h et pour un dp de 0.6 mm est illustré sur la figure III.10.

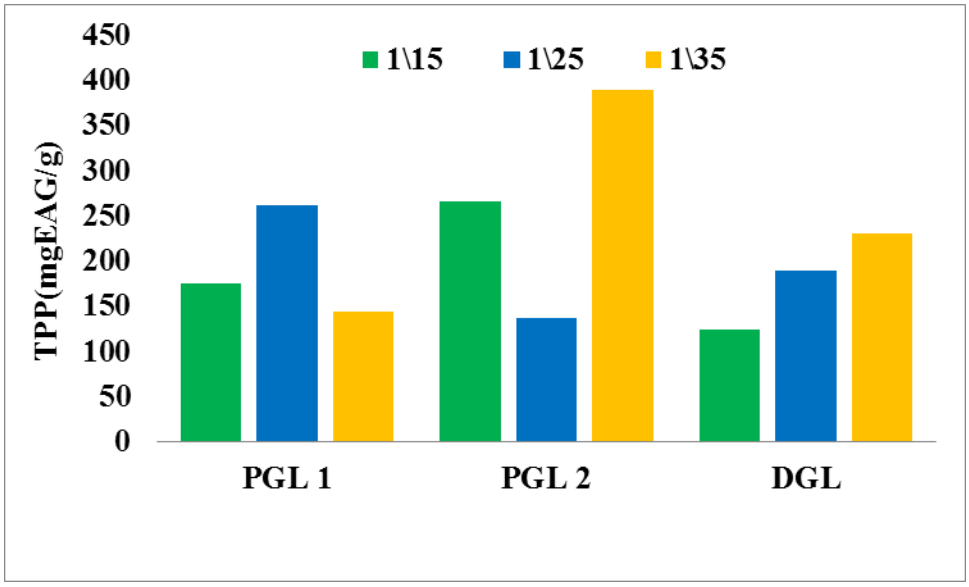


Figure III.10 : Effet du rapport solide/liquide sur l'extraction des polyphénols totaux, l'éthanol 50%, T= 55°C, t= 3h, dp= 0.6

L'analyse de la figure III.10 montre que pour PGL1 la teneur en polyphénols totaux augmente de 175.66 mg EAG/g à 262.22 mg EAG/g avec l'augmentation du rapport solide/liquide de 1/15 à 1/25, alors que pour une valeur plus élevée du rapport S/L (1/35) la teneur en polyphénols diminue (143.88 mg EAG/g). Au contraire la valeur optimale du rapport pondérale dans le cas de PGL2 pour obtenir le maximum de PPT (388.88 mg EAG/g) est 1/35. Concernant les feuilles de DGL la diminution du rapport solide/liquide, fait augmenter la quantité de polyphénols extraits. Comme pour le PGL2, le maximum de PPT obtenu dans la DGL est celui avec le rapport pondéral 1/35.

C. Effet de la température

L'effet de la température sur l'extraction des polyphénols totaux par l'éthanol 50% et sous les conditions : S/L=1/25g/ml, t=3h, dp=0.6mm pour les trois biomasses est représenté par la figure III.11.

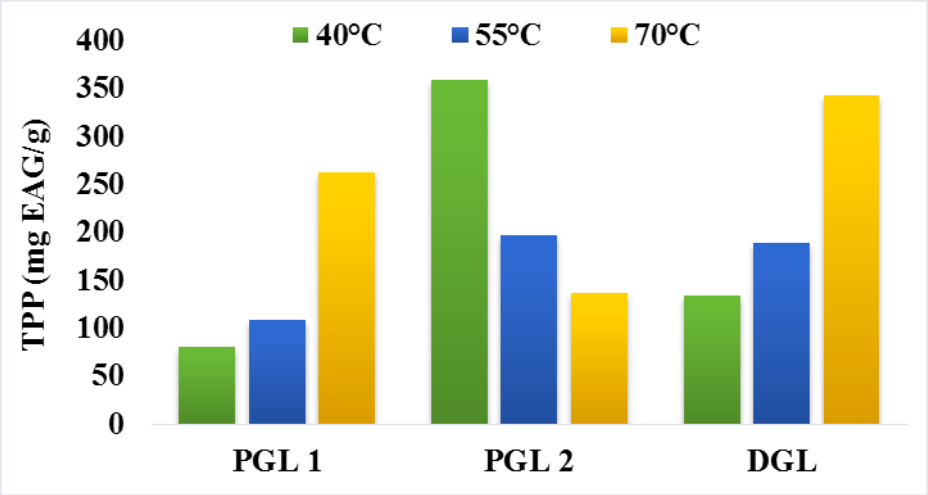


Figure III.11 : Effet de la température sur l'extraction des polyphénols totaux, Ethanol 50%, S/L=1/25 g/ml, t=3h, dp=0.6mm

Selon les résultats obtenus (figure III.11), nous constatons, pour PGL1 et DGL, une augmentation des polyphénols totaux dépendante de température, soit une augmentation de la teneur en PPT en fonction de l'augmentation de la température. A l'inverse, la teneur des polyphénols totaux de PGL2 est inversement proportionnelle à la température.

D. Effet du diamètre des particules

L'effet du diamètre des particules sur l'extraction des polyphénols totaux par l'éthanol 50% et sous les conditions : S/L=1/25g/ml, t=3h, T=55°C pour les trois biomasses est donné sur la figure III.12.

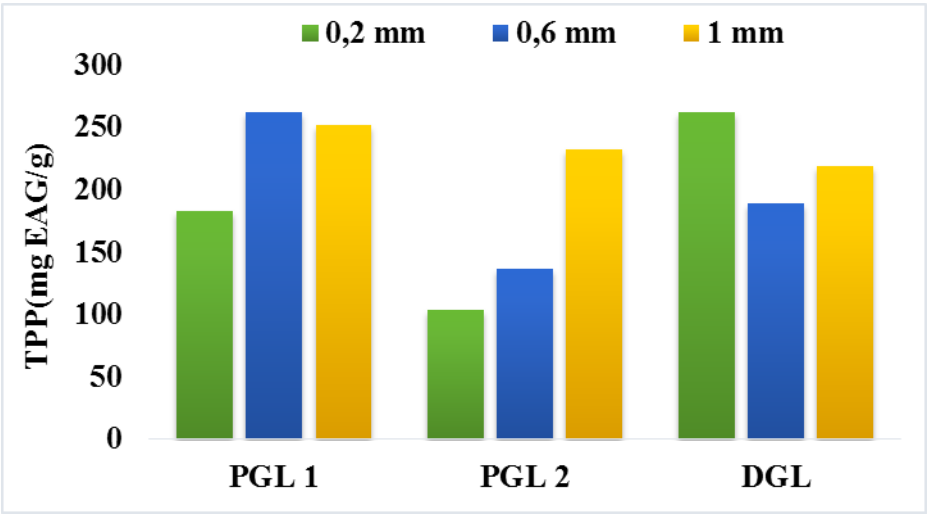


Figure III.12 : Effet du diamètre des particules sur l'extraction des polyphénols totaux, Ethanol 50%, S/L=1/25g/ml, t=3h, T=55°C

L'analyse de la figure III.12 montre que l'augmentation de la surface spécifique (diminution de la taille des particules) mène à une extraction meilleure de PPT à partir des feuilles de daphné garou. Ceci n'est pas le cas pour les écorces de grenades (PGL1 et PGL2) où la diminution de la taille des particules n'a pas abouti à l'amélioration de la teneur en PPT.

E. Effet du temps d'extraction

L'effet du temps de contact sur l'extraction des polyphénols totaux par l'éthanol 50% et sous les conditions : S/L=1/25g/ml, dp=0.6mm, T=55°C pour les trois biomasses est représenté sur la figure III.13.

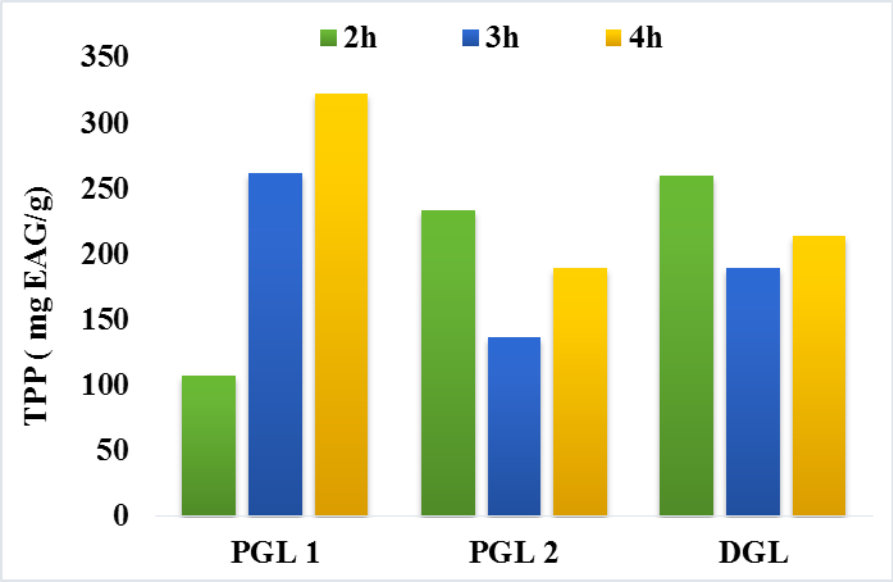


Figure III.13 : Effet du temps de contact sur l'extraction des polyphénols totaux, Ethanol 50%, S/L=1/25g/ml, dp=0.6mm, T=55°C

Les résultats obtenus (figure III.13) révèlent une extraction dépendante du temps d'extraction, soit une augmentation de la teneur en PPT avec l'augmentation du temps d'extraction pour PGL1 où nous enregistrons une teneur de 322.22 mg EAG /g obtenue après 4h d'extraction contre une teneur de 107.22 mg EAG /g obtenue après 2h d'extraction.

Pour PGL2 et DGL, l'augmentation de la durée d'extraction n'a pas amélioré la teneur en PPT. Les meilleures teneurs en PPT sont obtenues après 2h d'extraction avec des valeurs de l'ordre de 233.33 mg EAG /g et 259.44 mg EAG /g enregistrées pour PGL2 et DGL respectivement.

III.6.2. Dosage des flavonoïdes totaux

III.6.2.1. Principe

L'évaluation quantitative des flavonoïdes totaux dans les différents extraits est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) **[103]**. Ce dernier forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes (OH) des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 430 nm.

III.6.2.2. Protocol expérimental

Les différentes étapes réalisées pour le dosage des flavonoïdes des différents extraits par la méthode du trichlorure d'aluminium sont résumées sur la figure III.14. Le blanc utilisé a la même composition en remplaçant 0.2 ml de l'extrait par 0.2ml du solvant d'extraction.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la rutine comme contrôle positif à différentes concentrations (0, 25, 50, 75, 100 µg/ml) préparées à partir d'une solution mère (200µg/ml) de rutine. La courbe d'étalonnage de la rutine est donnée en annexe II.

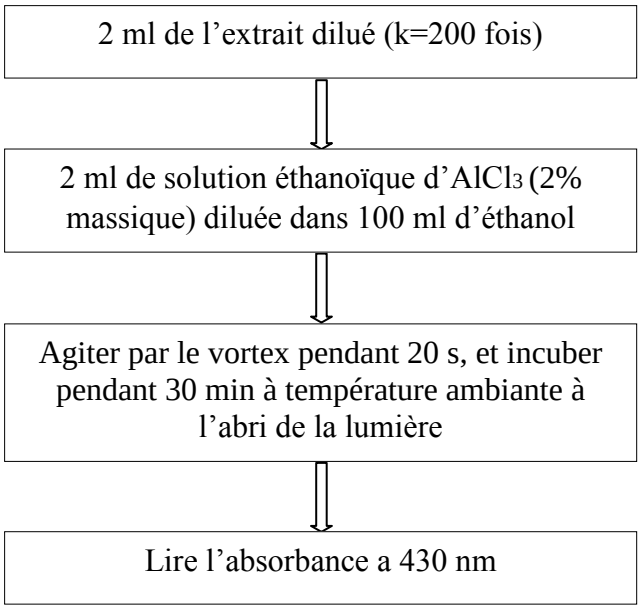


Figure III.14 : Etapes du dosage des flavonoïdes totaux

III.6.2.3. Calcul

La teneur en flavonoïdes totaux, exprimée en milligrammes équivalent de la rutine par gramme de la matière sèche, est calculée à partir de la formule suivante :

$$TF = \frac{Vs \times C \times k}{mp} \qquad \textbf{(III.3)}$$

Avec :

TF : Teneur en flavonoïdes (mg ERU/g)

Vs : Volume d'échantillon (ml)

C : Concentration de l'échantillon lue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

k : Facteur de dilution

mp: Masse de l'échantillon (g)

III.6.2.4. Résultats

A la lumière des résultats des teneurs en flavonoïdes, obtenus pour tous les extraits des trois biomasses, rapporté dans les figures III.15 et 16, et donné aussi dans l'annexe III, il ressort que :

- ✓ Tous les extraits testés sont riches en flavonoïdes.
- ✓ Les écorces de grenades semblent être la biomasse la plus riche en flavonoïdes avec des teneurs de l'ordre de 704.37 mg ERU/g et 489.12 mg ERU/g enregistrées pour PGL1 et PGL2 respectivement.
- ✓ La différence en taux de flavonoïdes observée entre les deux variétés de grenades PGL1 et PGL2 peut être attribuée au temps d'extraction qui se diffèrent entre les deux et aux conditions climatiques de la cultivation de chaque variété.
- ✓ Pour DGL, la meilleure teneur en flavonoïdes est de l'ordre de 380,62 mg ERU /g.

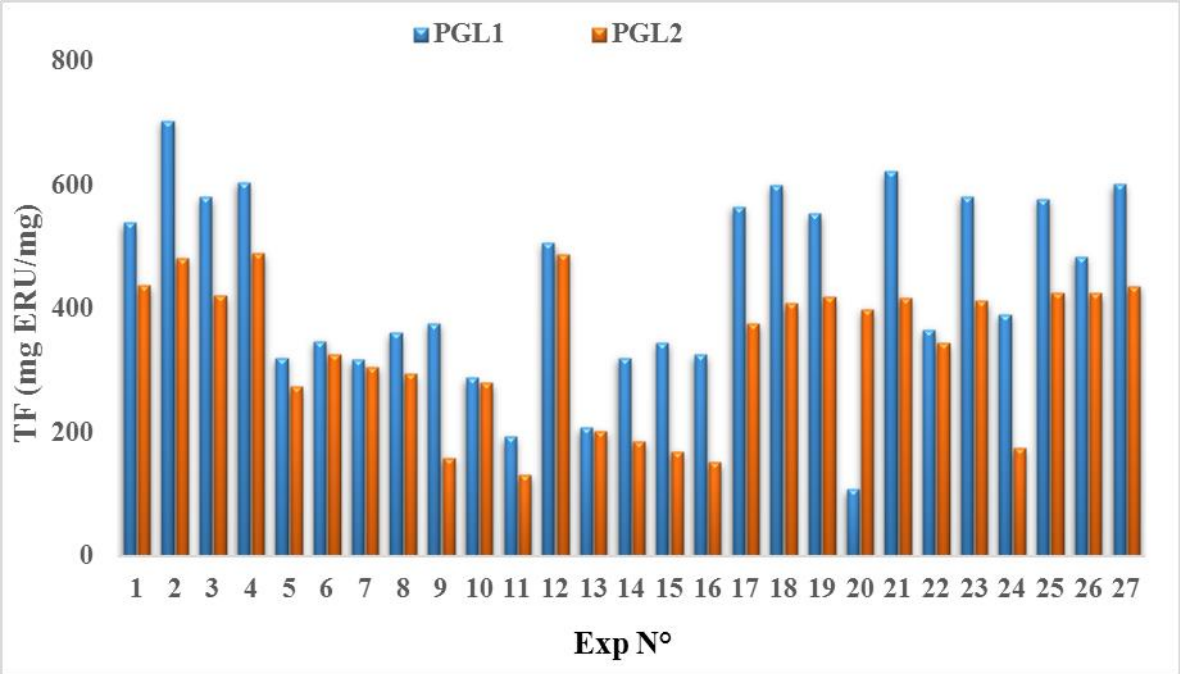


Figure III.15: Teneur en flavonoïdes des écorces de grenades

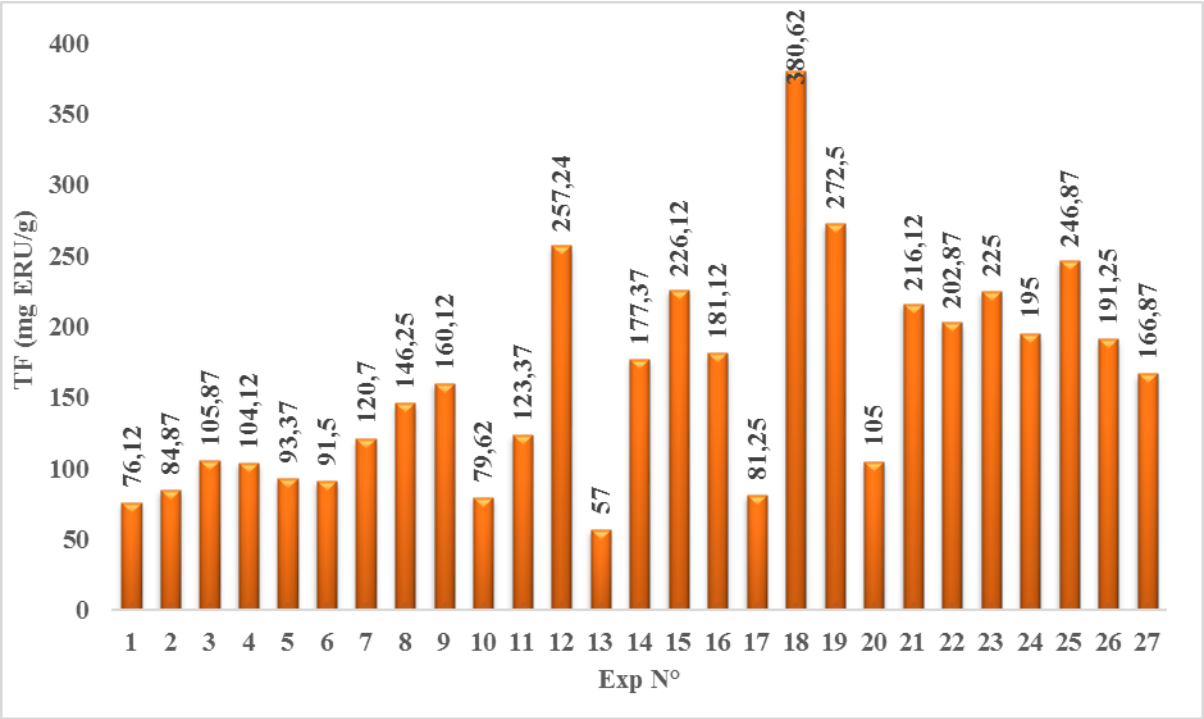


Figure III.16: Teneur en flavonoïdes de DGL

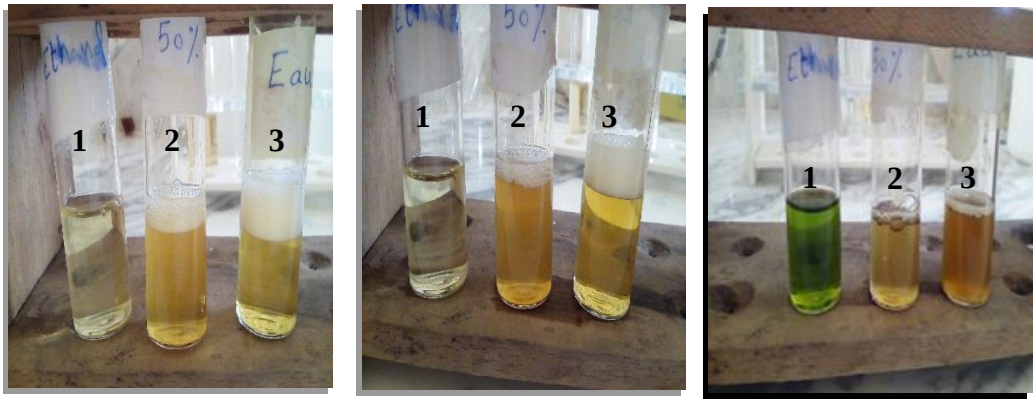
III.7. Evaluation des propriétés tensioactives

III.7.1. Test de moussage

La présence d'agent tensioactif ou saponines dans les extraits obtenus a été détectée par la méthode de moussage :

- Mettre 4 ml de l'extrait dans un tube à essai
- Agiter avec vortex pendant 3 min
- Laisser au repos 5 min
- Mesurer la hauteur de la mousse par une règle

Les résultats du test de moussage sont illustrés dans la figure III.17.



PGL1 **PGL2** **DGL**

Figure III.17: Test de moussage

(1) Extrait Ethanol ; **(2)** Extrait d'éthanol 50% ; **(3)** Extrait d'eau

- **Résultats**

La hauteur de la mousse formée dans chaque extrait sous les conditions : t=3h, T=55°C, S/L=1/25, dp=0.6 sont donnés dans le tableau III.9.

Tableau III.9: Hauteurs de la mousse

Extrait	Eau	Ethanol 50%	Ethanol
Hauteur de la mousse (mm)	**PGL1**		
	10	5	0
	PGL2		
	9	4	0
	DGL		
	3	2	0

Nous remarquons la formation de la mousse dans les extraits d'eau et ceux de l'éthanol 50%, alors qu'aucune mousse n'a été observée dans les extraits éthanoliques. Ces résultats signifient la présence des saponines dans les écorces de grenade ainsi les feuilles de daphné garou. De plus, les faibles hauteurs des mousses enregistrées pour les extraits de DGL signifient que cette biomasse est moins riche en saponine à l'inverse des extraits des écorces de grenade qui sont plus riches en saponine avec des hauteurs de mousses allant jusqu'à 10 mm.

Concernant la hauteur de la mousse (Tableau III.9), la différence observée entre les deux extraits d'eau et d'éthanol 50% peut être vraisemblablement attribuée d'un côté à la teneur de

chaque extrait en saponine, et d'un autre coté à la nature des molécules constitutives du solvant d'extraction qui sont responsable de l'encapsulation de l'air pour former la mousse **[104]**.

III.7.2. Tension superficielle

III.7.2.1. Principe et méthode

La tension de surface (TS) est un paramètre physicochimique important qui caractérise les composés tensioactifs. Dans le but de voir dans quel sens agit la variation des paramètres d'extraction (température, temps d'extraction, nature du solvant…) sur les propriétés superficielles des extraits des trois biomasses, nous avons mesuré la tension superficielle des différents extraits obtenus.

Les mesures de tensions de surfaces ont été réalisées grâce à un tensiomètre CSC de type Du Nouy (Du Nouy 70545) en utilisant la technique d'arrachement de l'anneau et en opérant à la température ambiante (23°C) (voir figure III.18). Ce système consiste en un anneau en platine mince, suspendu horizontalement au bras d'une balance tarée. Il s'agit d'immerger l'anneau dans la solution à étudier, puis de le remonter jusqu'à la position limite où l'anneau est uniquement retenu par les molécules présentes à la surface de la solution. La lecture de la valeur de la tension superficielle se fait au moment de l'arrachement de l'anneau de la surface de solution. Les valeurs sont affichées sur un disque gradué en dynes/cm ce qui correspond à des mN/m.



Figure III.18: Tensiomètre Du Nouy

III.7.2.2. Résultats

Les résultats des tensions superficielles(annexe III) montrent que tous les extraits testés mènent à une diminution de la tension superficielle par rapport à celle du solvant d'extraction (55 dyn/cm de l'eau, 33.5 dyn/cm de l'éthanol 50% et 28.3 dyn/cm d'éthanol). Ceci reflète la présence des molécules ayants un pouvoir tensioactif remarquable, qui leurs donne la possibilité de diminuer cette tension superficielle d'une manière variée selon les conditions d'extraction.

L'effet des différents paramètres d'extraction sur la tension superficielle est étudié dans ce qui suit :

A. Effet du solvant d'extraction

L'Effet du solvant d'extraction sur la tension superficielle des différents extraits obtenus sous les conditions suivantes : s/l =1/25 g/ml, T = 55°C, t=3h, dp=0.6mm est représenté sur la figure III.19.

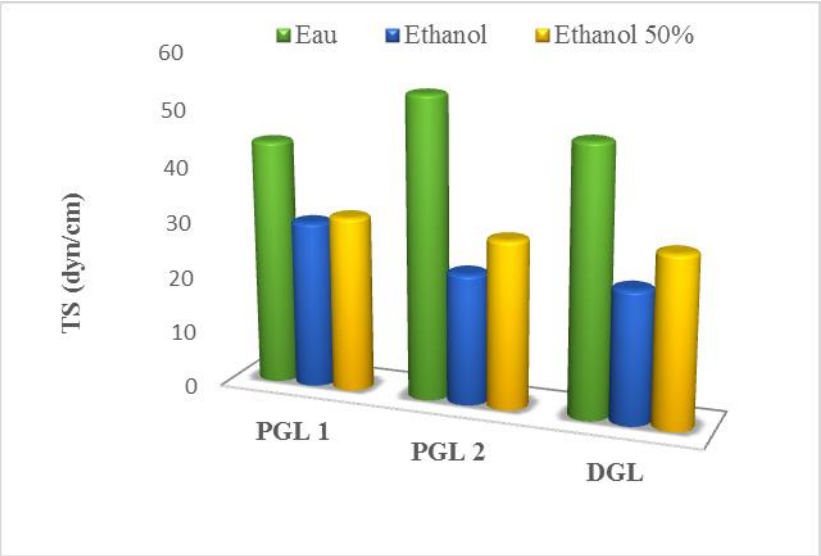


Figure III.19 : Effet du solvant sur la tension superficielle

L'analyse de la figure III.19 montre que pour les trois biomasses étudiées, les extraits éthanoïques possèdent les tensions superficielles les plus faibles (20~25 dyn/cm). Ceci peut être justifié par la faible tension superficielle de l'éthanol et de son pouvoir extractif pour les composés à effet tensioactif (saponine).

B. Effet du rapport solide/liquide

L'Effet du rapport solide/liquide sur la tension superficielle des différents extraits obtenus avec l'éthanol 50% sous les conditions suivantes : T = 55°C, t=3h, dp=0.6mm est représenté sur la figure III.20.

Selon la figure III.20, le rapport solide/liquide : 1/25 a permis d'enregistrer les meilleures TS (29.4 ~ 30.5 dyn /cm) et ceci pour les trois biomasses étudiées. De plus, le changement du rapport pondéral de 1/35 vers 1/15 pour DGL, n'a pas abouti à une grande variation de

l'extraction des composés à effet tensioactif où la TS est 33.6 dyn/cm comparée à 30.5 dyn/cm obtenue pour un rapport de 1/15.

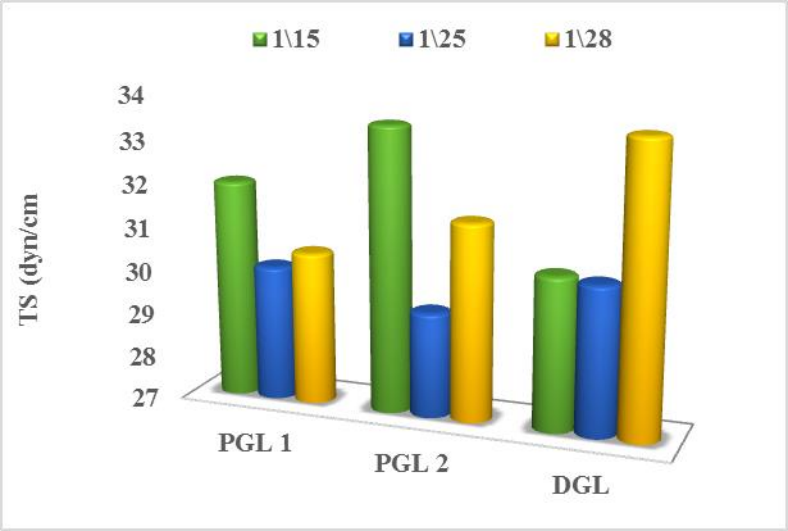


Figure III.20 : Effet du rapport solide/liquide sur la tension superficielle
Ethanol 50%, T = 55°C, t=3h, dp=0.6mm

C. Effet de la température

Les résultats relatifs à l'effet de la température sur la tension superficielle des différents extraits obtenus par l'éthanol 50% avec un rapport solide/liquide : 1/25 pendant 3 h et pour un dp=0.6mm sont regroupés dans la figure III.21.

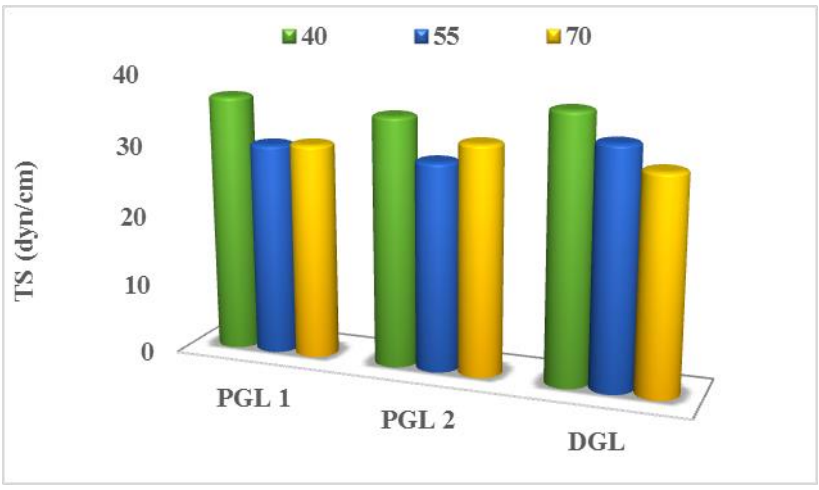


Figure III.21: Effet de la température sur la tension superficielle
Ethanol 50%, S/L=1/25, t=3 h, dp=0.6mm

L'analyse de la figure III.21, nous a permis de tirer les points suivants :

- Pour DGL, la température 70°C est optimale pour extraire des composés à effet tensioactif (TS = 30.4 dyn/cm).
- Pour les deux PGL, la température 55°C est considérée optimale pour extraire des composés à effet tensioactif. La plus faible TS (29 dyn/cm) est enregistrée pour l'extrait PGL2 obtenu à 55°C.

D. Effet du diamètre des particules

L'effet du diamètre des particules sur la tension superficielle des différents extraits obtenus sous les conditions suivantes : éthanol 50%, T= 55°C, t=3h, s/l=1/25 est représenté sur la figure III.22.

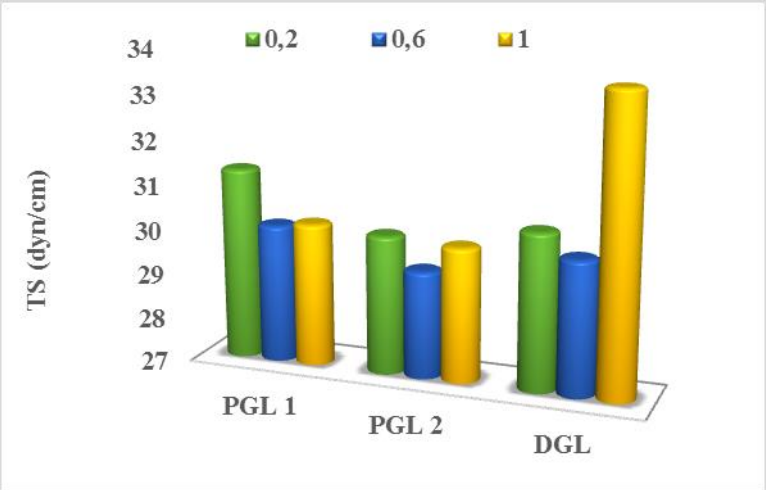


Figure III.22: Effet du diamètre des particules sur la tension superficielle
Ethanol 50%, T= 55°C, t=3h, s/l=1/25

Les résultats obtenus **(**figure III.22) montrent que :

- Le diamètre moyen de 0.6 mm a permis d'enregistrer les meilleures TS et ceci pour tous les extraits des trois biomasses étudiées.
- Ce diamètre est la valeur optimale pour l'extraction d'un maximum de saponines.

E. Effet du temps d'extraction

L'effet du temps d'extraction sur la tension superficielle des différents extraits obtenus sous les conditions suivantes : éthanol 50%, T= 55°C, s/l=1/25, dp=0.6mm est représenté sur la figure III.23.

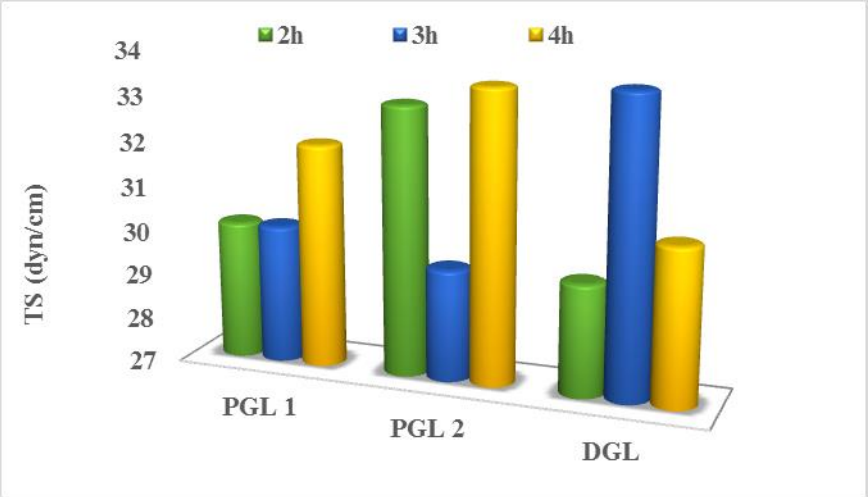


Figure III.23: Effet du temps sur la tension superficielle

L'analyse de la figure III.23 montre que le temps de contact optimal pour extraire des composés à effet tensioactif varie d'une biomasse à une autre (2h pour PGL 1 et DGL et 3h pour PGL2). De plus, l'augmentation de la durée d'extraction de 2h à 3h mène à :
Une amélioration de l'abaissement de la TS de l'extrait de PGL2 où la TS passe de 33 dyn/cm à 29.5 dyn/cm.

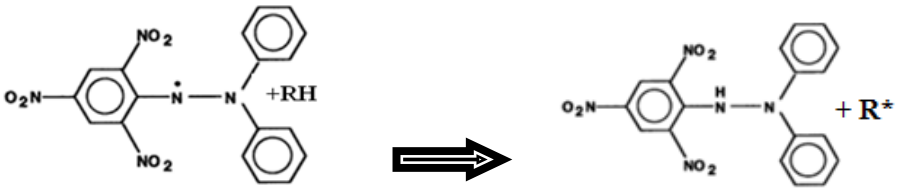
Une augmentation de la TS de l'extrait de DGL où la TS passe de 29.5 dyn/cm à 33.6 dyn/cm. Ceci peut être due à l'aspect plus au moins visqueux observé de cet extrait

III.8. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH).

III.8.1. Principe de la méthode du piégeage du radical DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 517nm. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure III. 24). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire **[105]**.



DPPH• (radical libre) DPPH, H (non radical)

RH : antioxydant, R• : radical libre

Figure III. 24 : Réaction du DPPH avec un antioxydant **[106]**

III.8.2. Protocole opératoire

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 0.004% de DPPH dans l'éthanol, par la suite, 1500 µl de chaque extrait ayant une gamme de concentration [0.01,0.02,0.03,0.04,0.05,0.06,0.08](mgEAG/ml) est ajouté à 800 µl de la solution de DPPH, après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant (voir figure III. 25).

Le paramètre IC50 (concentration inhibitrice à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui conduit à la perte de 50% de l'activité de DPPH. Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical. Les résultats exprimés en IC50 sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque échantillon. Le pouvoir d'inhibition, exprimé en %, est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs Extrait})}{\text{Abs Control}} \times 100 \qquad \textbf{(III.5)}$$

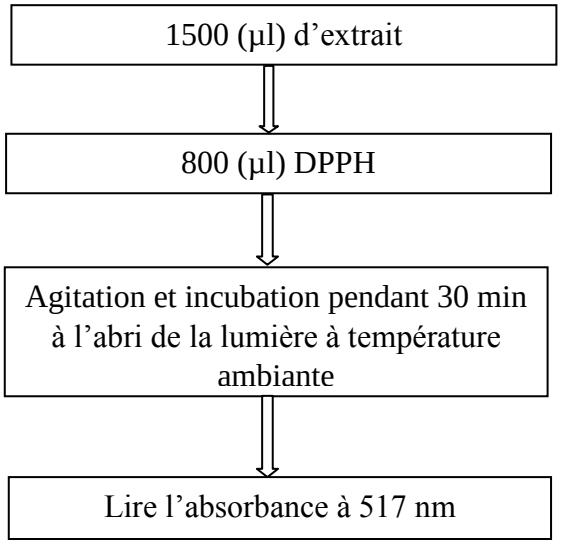


Figure III.25: Protocole expérimental du dosage DPPH

III.8.3. Résultats et discussion

L'activité antioxydante des différents extraits (exprimée en tant que PI (%)) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée en suivant la réduction de ce radical par spectrophotomètre UV visible.

Les profils des activités antiradicalaires obtenus sont présentés sur la figure III.26.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.10

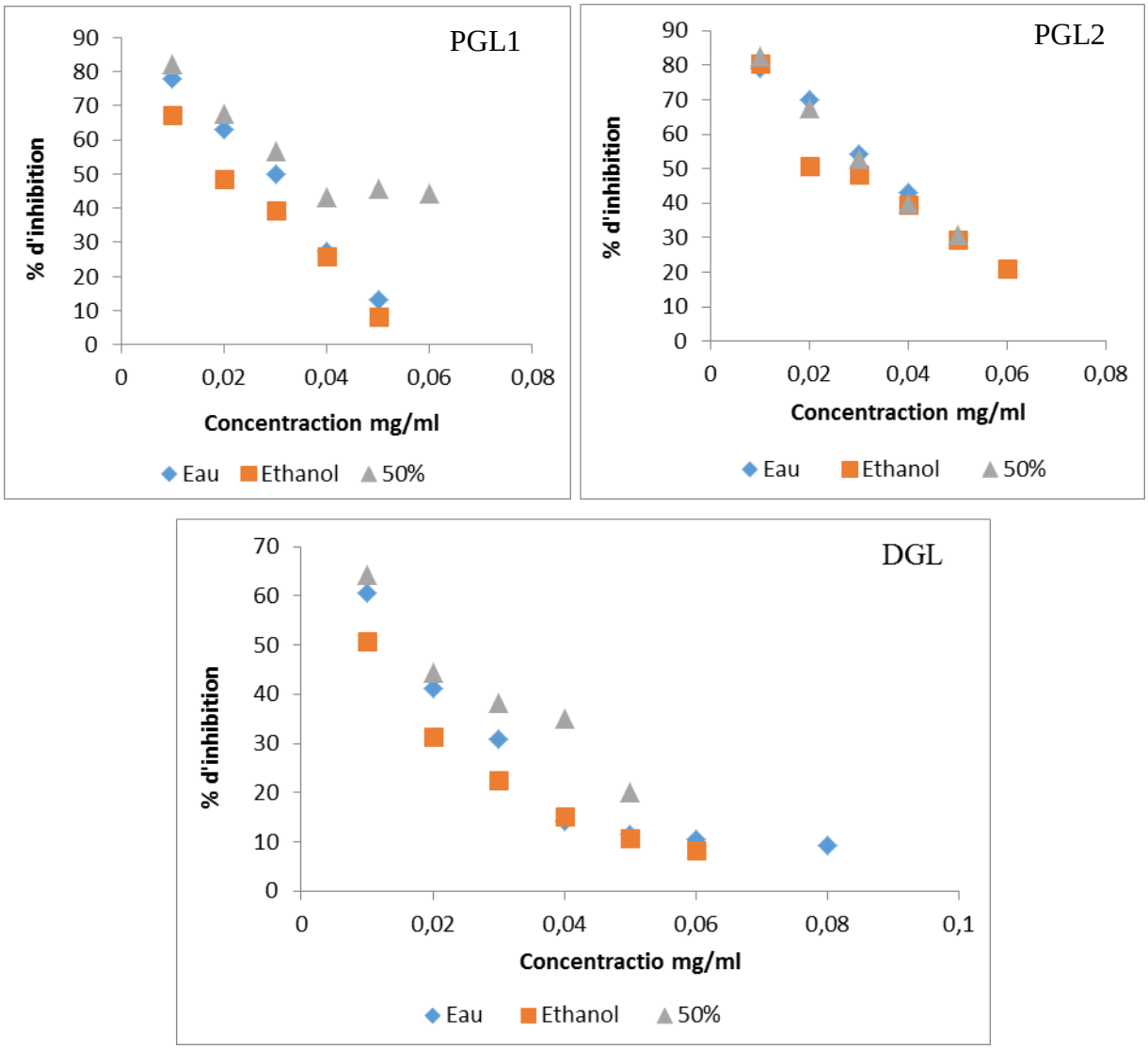


Figure III.26 : Activité antioxydante des différents extraits

Tableau III.11: Valeurs approximatives des CI_{50} des différents extraits testés

	CI_{50} (mg/ml)		
	Eau	**Ethanol 50%**	**Ethanol**
PGL 1	0.02	0.04	0.02
PGL 2	0.03	0.03	0.03
DGL	0.0073	0.02	0.0017

L'examen de la figure III. 26 et du tableau III.10 laisse constater que tous les extraits testés possèdent une activité antioxydante et ils sont capables de piéger le radical DPPH. La valeur d'IC50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, comme elle exprime la quantité de l'antioxydant nécessaire pour diminuer 50% de la concentration du radical. Plus IC50 est faible plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée. Comme le montre le tableau III.10, les valeurs de IC50 sont de l'ordre de 0.02 jusqu'à 0.04 mg/ml pour PGL1 et 0.03 mg/ml pour PGL2, et inférieures à 0.02 mg/ml pour DGL.

Ces résultats montrent que l'extrait éthanoïque de DGL est le plus efficace avec IC_{50} la moins élevée (0.0017 mg/ml) suivi par l'extrait de l'eau avec IC_{50} de l'ordre de 0.0073 mg/ml qui sont proches à celle de l'acide gallique (0.0065 mg/ml). Ces extraits sont les plus riches en composés phénoliques. Ceci montre bien que les polyphénols sont des donateurs efficaces d'atome d'hydrogène au radical DPPH en raison de leurs structures chimiques idéales comme le suggère Boubekri Ch. (2014) **[105]**.

III.9. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits testés a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose (antibiogramme). Elle repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien (l'extrait) sur la cible (microorganisme) est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Ainsi, dans cette méthode il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester **[107]**. Les deux souches testées dans cette étude sont données dans le tableau III.11.

Tableau III.11. Souches microbiennes

Souches	Gram	Source
Escherichia coli	Négatif	Urine humaine (EPSP)
Staphylococcus aureus	Positif	Urine humaine (EPSP)

III.9.1. Mode opératoire

Toutes les manipulations du test antimicrobien ont été faites dans une zone stérile selon les étapes suivantes :

a) Préparation de la suspension bactérienne

- Prélever quelques colonies isolées et les incorporer dans l'eau physiologique.
- Agiter et homogénéiser la suspension avec vortex.
- 2 tubes correspondant aux deux souches utilisées ont été préparés.
- Incuber les suspensions bactériennes dans l'étuve à 37°C pendant 20 min.

b) Préparation du milieu de culture

- Liquéfier et stériliser le milieu de culture Muller-Hinton dans un autoclave à 121°C pendant 15 min.
- Couler les boites de pétrie avec le milieu (Figure III.27.a).
- Laisser refroidir et solidifier à température ambiante.

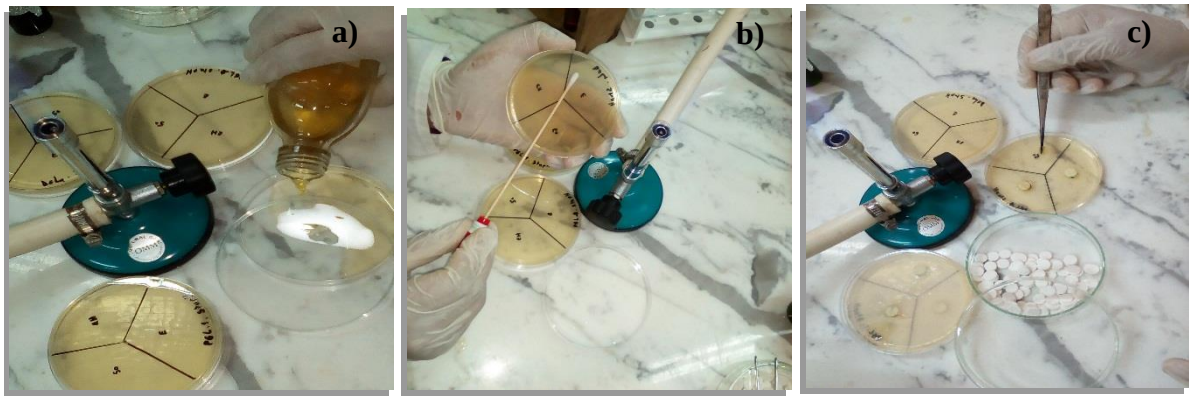


Figure III.27 : Différentes étapes d'antibiogramme

c) Ensemencement, application des disques et incubation

- Ensemencer aseptiquement avec un écouvillon stérile la totalité de la surface gélosée par la souche appropriée (Figure III.27.b).
- Imbiber les disques avec les extraits à l'aide d'une pince stérile, puis les déposer délicatement sur la surface des boites Pétri (Figure III.27.c).
- Incuber les boites Pétri dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

d) Lecture

- Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle graduée.
- L'absence de la zone claire : inhibitrice négative (-).
- La présence de la zone claire : inhibitrice positive (+).

III.9.2. Résultats et discussions

Le test antimicrobien a été effectué sur les extraits présentant les teneurs les plus élevées en composés phénoliques et flavonoïdes. Les résultats obtenus pour la PGL1, PGL2 et le DGL sont donnés dans les tableaux III.12, III.13 et III.14 respectivement.

L'analyse des résultats donnés sur les tableaux III.12, III.13 et III.14 a permis de soulever les points suivants :

- Les résultats d'antibiogramme obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton révèlent que l'activité antibactérienne des extraits testés est en fonction de la bactérie cible.
- Pour tous les échantillons testés, les extraits éthanoïques présentent les effets antibactériens les important par rapport aux autres extraits (avec l'eau et avec l'eau /éthanol :50/50).
- Les extraits des deux variétés de grenade possèdent tous une activité antibactérienne vis-à-vis *S.aureus* dont les diamètres des zones d'inhibition variés entre 19 mm et 25 mm pour les extraits éthanoïques de PGL2 et PGL1 respectivement.
- Les extraits de grenade montrent aussi une activité antibactérienne vis-à-vis *E-Coli* avec des diamètres des halos d'inhibition variant de 12 à 26 mm.
- Quant à DGL, les deux souches testées (*E-Coli* et *S.aureus*) ont montré une bonne résistance à tous les extraits de DGL avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 10 mm à 13 mm, à l'exception d'un seul extrait éthanoïque (riche en flavonoïdes) où *S.aureus* a montré une sensibilité modérée avec une zone d'inhibition de l'ordre de 19 mm.

Tableau III.12 : Test de sensibilité des souches étudiées aux extraits de PGL1

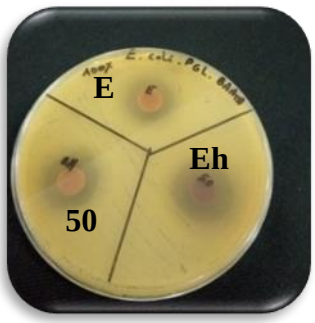
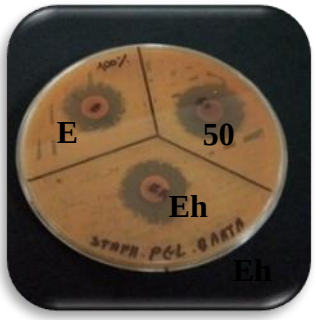
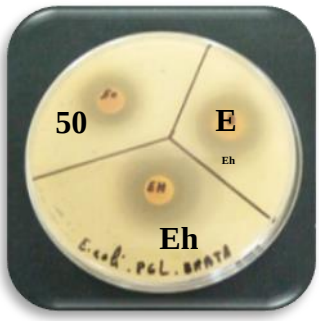
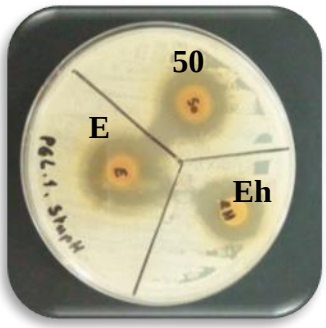
Extraits	**Souches bactériennes**	
	Escherichia coli	***Staphylococcus aureus***
	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)	
	Selon polyphénols	
Eau	18	21
Eau/ Ethanol 50%	19	24
Ethanol	21	25
		
	Selon flavonoïdes	
Eau	24	21
Eau/ Ethanol 50%	20	21
Ethanol	26	24
		

Tableau III.13 : Test de sensibilité des souches étudiées aux extraits de PGL2

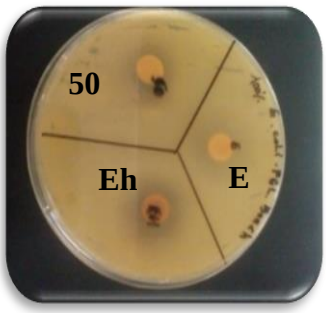
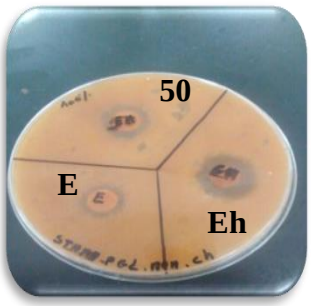
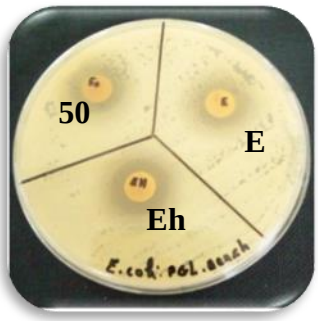
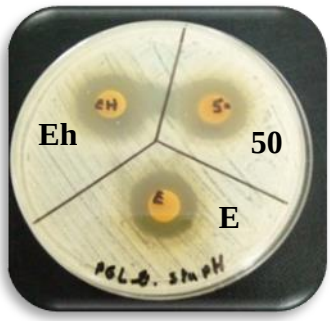
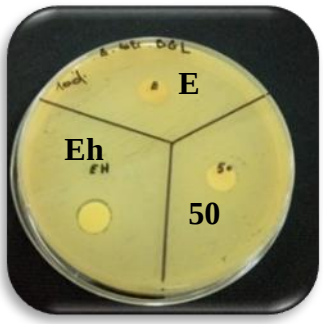
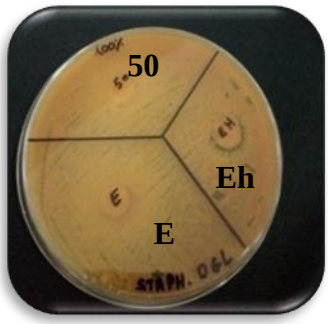
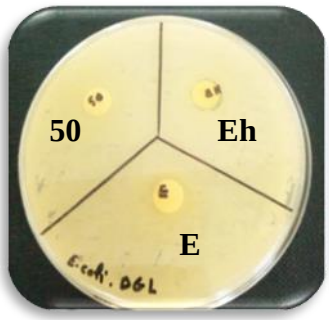
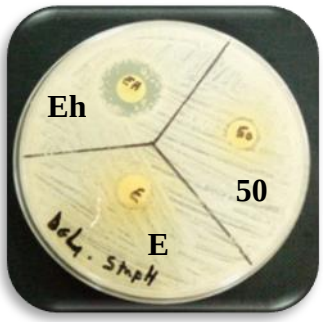
Extraits	**Souches bactériennes**	
	Escherichia coli	***Staphylococcus aureus***
	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)	
	Selon polyphénols	
Eau	12	14
Eau/ Ethanol 50%	15	18
Ethanol	20	19
		
	Selon flavonoïdes	
Eau	14	20
Eau/ Ethanol 50%	17	21
Ethanol	18	23
		

Tableau III.14 : Test de sensibilité des souches étudiées aux extraits de DGL

Extraits	**Souches bactériennes**	
	Escherichia coli	***Staphylococcus aureus***
	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)	
	Selon polyphénols	
Eau	10	10
Eau/ Ethanol 50%	10	10
Ethanol	11	13
		
	Selon flavonoïdes	
Eau	10	10
Eau/ Ethanol 50%	10	10
Ethanol	11	19
		

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles qui existent en Algérie et plus précisément dans la wilaya de Médéa. Dans ce contexte, on s'est intéressé à étudier l'extraction des composés phénoliques et à exploiter le pouvoir tensioactif de deux espèces végétales à savoir *Punicagranatum* L (grenade) et *Daphnegnidium* (daphné garou). Les parties étudiées sont l'écorce de grenade et les feuilles de daphné garou.

L'extraction à chaud menée en batch a été réalisée suivant une matrice expérimentale composée de 27 essais, établie par le logiciel de plans d'expériences MOODDE 6, selon une méthode factorielle fractionnaire à deux niveaux. Cinque facteurs ou paramètres ont été étudiés : nature du solvant, température (T), rapport solide/liquide (S/L), diamètre des particules (dp) et temps de l'extraction (t). Les valeurs de ces paramètres ont été fixées en se basant sur des travaux antérieurs.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont résumés comme suit :

- Caractéristiques physico-chimiques :
  - ✓ Conductivité électrique modérée pour les extraits des trois biomasses
  - ✓ pH acide pour les extraits de grenade et acide faible à neutre pour le daphné garou.
- Pouvoir tensioactif :
  - ✓ Présence de substance tensioactives « saponines » dans les trois extraits
  - ✓ Une tension superficielle proche de 29 dyne/cm a été atteinte
- Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes:
  - ✓ Pour la première origine de grenade un maximum est atteint avec l'eau : 368.66 (mg EAG/g) et 704.37 (mg ERU/g) respectivement.
  - ✓ Pour la deuxième origine de grenade un maximum est atteint avec l'éthanol : 430.88 (mg EAG/g) de polyphénols totaux et 489.12 (mg ER /g) de flavonoïdes.
  - ✓ Concernant le daphné garou le meilleur rendement en polyphénol totaux est égale à 574.55 (mg EAG/g) avec l'eau, et 380.62 (mg ER /g) de flavonoïdes avec l'éthanol 50%.

- Pouvoir antioxydant :
  - ✓ Une concentration d'inhibition de 50% égale à 0.0017 mg/ml pour l'extrait éthanolique de daphné garou et 0.0073 mg/ml pour l'extrait aqueux.
- Activité antibactérienne :
  - ✓ Les extraits des deux variétés de grenade possèdent une activité antibactérienne remarquable comparée au daphné garou.
  - ✓ Les extraits d'éthanol pur ont montré un effet antibactérien le plus important vis-à-vis du *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* par rapport aux extraits aqueux et 50% éthanol.

Afin d'élargir cette étude entamée sur les deux espèces grenade et daphné garou, d'autres aspects peuvent être développés dans le futur tels que :

- Améliorer les méthodes d'extraction (microonde, ultrason,…..) et optimiser les conditions opératoires dans les solvants aqueux pour éviter la toxicité des solvants organiques.
- Purifier les constituants extraits afin d'étudier leurs structures par HPLC et CCM pour mettre le point sur ceux dotés d'activités biologiques.
- Etudier les différentes activités biologiques pour ouvrir d'autres possibilités d'exploitation en biotechnologie et en médecine.

Références bibliographiques

[1] Nkhili E (2009) Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat.
Université Cadi Ayyad – Marrakech

[2] Lansky E. P., Newman R. A. (2007).-*Punicagranatum*(pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of Pharmacology.109:p 177-206.

[3] Levin G. M. (1994). Pomegranete (Punicagranatum) plant genetic resources in Turkmenistan. Plant Genetic Resources Newsletter, 97:p 31-37.

[4] Al-Said F.A., Opara U.L. Al-Yahyai R.A. (2009). Physico-chemical and textural quality Attributesofpomagranate cultivars (Punicagranatum L.) grown in the Sultanate of Oman. Journal of Food Engineering 90: p 129-134.

[5] Holland D., Hatib K., Bar-Ya'akov I. (2009). Pomegranate: botany, horticulture, breeding. Horticultural Reviews, 35: p 127-191.

[6] Fawole O.A., Opara U.L., Theron K.I. (2011). Chemical and phytochemical properties and antioidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa.Food Bioprocess Technology.

[7] FatopeM.O.,AlBurtomani S.K.S., Takeda Y. (2002). Monoacylglycerol from PunicagaranatumSeed Oil. J. Agric, Food Chem, 50 (2): p 357-360.

[8] Chopra C.L., Bhatia M.C., Chopra K. (1960). In vitro antibacterial activity of oils from Indianmedicinal plants-I, Journal of American Pharmacy Association (Science Edition), 49: P 780.

[9] Kirthikar K.R., Basu B.D. (1975). Indian Medicinal plants, 2nd Edition, Bishen Singh an MahendraPal Singh, Dehradun, p 1084-1087

[10] Spichiger R.E., Savolainen V., et al. (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs, Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales, Editions Presses polytechniques et universitaires romandes, 3, p 413.

[11] Dallas, S. L., Bonewald L.F. (2010). "Dynamics of the transition fromosteoblast toosteocyte." Ann N Y AcadSci1192: p 437-443.

[12] Calin Sanchez Angel., CarboneliBanaching Angel A. (2005). La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydantgranatum+ et université Miguel Hermandez (EDS), Murcia Espagne, p 77.

[13] Gil, M. I., Tomas-Barberan F. A., et al. (2000)."Antioxidantactivity of pomegranatejuiceanditsrelationshipwithphenolic composition and processing."JAgric Food Chem**48** (10): p 4581-4589.

[14] Al-Maiman, S. A., Ahmad.D. (2002)."Changes in physical and chemicalpropertiesduringpomegranate (Punicagranatum L.)fruit maturation." Food chemistry**76**: p 437-441.

[15] Kulkarni, A. P. and Aradhya.S. M. (2005). "Chemical changes and antioxidant tactivityin pomegranate arilsduring fruit development." Food chemistry**93**: p 319-324.

[16] Mirdehghan, S. H. and Rahemi M. (2007). "Seasonal changes of mineralnutrients and phenolics in pomegranate (Punicagranatum L.) fruit." ScientiaHorticulturae**111**: p 120-127.

[17] Schwartz, E.,. Tzulker R., et al. (2009). "Environmental conditions affect the color, taste, andantioxidantcapacity of 11 pomegranate accessions' fruits." J Agric Food Chem**57**(19): p 9197-9209.

[18] Al-Muammar, M. N. and Khan F. (2012). "Obesity: the preventive role of the pomegranate(Punicagranatum)." Nutrition **28**(6): 595-604.

[19] L'officinal. (2011). Phytothérapie Nature te Sante : La grenade fruit du grande.

L'officinal (EDS),N°86 3p.

[20] Prashanth D et Asha M.K. (2001). Antibacterial activity of *Punicagranatum*.*Fitoterapia*.N°72. p. 171-173.

[21] Das S., Sama G. (2009). Antidiabetic Action of EthanolicExtracts of *Punicagranatum*Linn.inalloxan-inducedDiabeticAlbino Rats. Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences, vol 2, no 1: p 14-21.

[22] El-Habibi E.M. (2013). Renoprotectiveeffects of *Punicagranatum*(pomegranate) againstadenine-inducedchronicrenalfailure in male rats. Life Science Journal, vol 10, no 4, p. 2059-2069.

[23] Basu A, Penugonda K.(2009). Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. NutrRev.67 (1): p49-56.

[24] Shukla M. (2008). Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (Punicagranatum L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE 2 production in human chondrocytes *in vitro*. Journal of inflammation.

[25] AL-Saeed, M.H., Hadi, N.S. (2015). Etude de l'effet des iso flavonoïdes extraits de l'écorce de *Punica granatum* sur la fertilité et les caractéristiques du sperme chez les males des lapins ». Université de Basrah, Iraq.

[26] Kanoun K. (2004). Etude de l'efficacite de l'extrait ethanolique d'ecorces de punica granatum linn sur deux souches phytopathogenes: assocyhta rabiei (pass.) labr. Et fusarium oxysporum f. sp. Radicis-lycopersici . European Scientific Journal.

[27] Neurath A. (2005). Punicagranatum (Pomegranate) Juice Provides an HIV-1 Entry Inhibitor and Candidate Topical Microbicide. Annals of the New York Academy of Sciences. P 311-327.

[28] Lansky E. (2005). Pomegranate (Punicagranatum) pure chemicals show possible

synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™ Investigational new drugs. P 121-122.

[29] Kulkarni S.S., Gokhale A.V, et al. (2011). Cotton dyeing with natural dye extracted frompomegranate (Punicagranatum) peel, Univ. J, Envi-ron, Res, Technol, 1,p 135–139.

[30] Ioannis A., George Z. K.(2014). Agricultural peels for dye adsorption, A review of recent literature, Journal of Molecular Liquids 200, p 381–389.

[31] Sweetie R. K., Rao M.S, et al.(2012). Active chitosanepolyvinylalcohol films with naturalextracts, Food Hydrocolloids 29, p 290-297.

[32] Quézel P., Santa S. (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, p.631.

[33] Mohammedi, Z. (2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie, Thèse de doctorat, Université Abou BekrBelkaid Tlemcen.

[34] Halda JJ. (1998). Some taxonomic problems in the genus Daphne L. acta musei richnoviensis section nature,5: p 133-160

[35] Sovrlic MM.et manojlovic NT.(2016). plants from the genus daphne :A review of its traditional uses ,phytochemistry biological and pharmacological activity serbian journal of experimental and clinical research,18(1) :p 69-80.

[36] Marques R., Sousa M.M., Oliveira M.C., Melo M. J.(2009). Characterization of weld (*Reseda luteola*L.) and spurge flax (*Daphne Gnidium*L.) by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry in Arraiolos historical textiles, Journal of Chromatography A, 1216: p 1395–1402.

[37] Deian M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L., and M.A. (2003). Dessì*a* Chemical Composition and Antioxidant Activity of Extracts from *Daphne gnidium*L. Journal of the American Oil Chemistry Society, 80, p 65-70.

[38] Nowik W.(2005). HPLC-PDA characterisation of Daphne gnidium L. (Thymeleaceae) dyeing extracts using two différent C-18 stationary phases, Journal of Separation Science, 28,p 1595-1600.

[39] Bellakhdar J.,Claisse R., Fleurentin J., Younos C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia, Journal of Ethnopharmacology, 35,p 123-243.

[40] Cottigli F.,LoyG., Garau D., FlorisC.,Casu M., Pompei R., Bonsignore L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of Daphne gnidium L. Phytomedicine, 8 ,p 302-305.

[41] ChaabaneF.,Krifa M., Matera E ., Loussaeif A., (2014). M.Geneviève, D.Franca, K.Ghedira,C. Dumontet, L. C. Ghedira, *In vitro* antileukaemic activity of extracts from Daphne gnidium leaves against sensitive and multidrug resistant K562/R7 cells, Tumor Biology, 35, p 8991-8998.

[42] Chaabane F., Boubaker J., Loussaif A., NeffatiA ., Kilani-Jaziri S ., Ghedira L K . (2012). Chekir-Ghedira, Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of Daphne gnidium leaf extracts, Journal of the International Society for Complementary Medicine Research, 12, p 153.

[43] Harizi H.,Chaabane F .,Ghedira K., Chekir-Ghedira L.,(2011). Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from Daphne gnidium L, Cellular Immunology, 267, p 94.

[44] Mohammedi Z. et Atik F. (2013). fungitoxic effect of natural extracts on mycelial growth, spore germination and aflatoxin B1 production of Aspergillus flavus. Australian journal of crop science, 7(3):P 293-298.

[45] Vidal V ., Potterat O , S., Louvel O,O.,Hamy O., Mojarrab M ., Sanglier J. J ., Klimkait T ., Hamburger M. (2012) . Library-based discovery and characterization of Daphnanediterpenes as potent and selective HIV inhibitors in Daphne gnidium L, Journal of Natural Products, 75,p 414-419.

[46] Chaabane F.,pinon A.,Simon A .,ghedira K .,et chekir-Ghedira L.(2013).phytochemical potential of daphne gnidium in inhibiting growth of melanoma cells and enhancing melanogenesis of B16-F0 melanoma. Cell biochemistry and function,31(6):p 460-467.

[47] Cardon D ., Andary C . (2001)."New historical and chemical infor-mation on a wild mediterranean dye-plant, Daphne gnidi-um", Dyes in History and Archaeology, 16-17, Archetype Publications, London, p.9.

[48] Waksmundzka-Hajnos M., &Sherma, J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical ience. Chromatographic Science Series, p 477-478.

[49] Dai J.,et Mumper R. J. (2010). Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules*, **15**(10): p7313-52.

[50] Visioli F., Borsani L., et Galli, C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research*, **47**: p 419–425.

[51] Stalikas C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. J. Sep. Sci. 30, p 3268 – 3295.

[52] Dangles O. (2006).*The physico-chemical properties of polyphenols* (Tech & Doc). *Lavoisier, 17*:p 64.

[53] Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids onmammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *PharmacolRev*, 52: p 673-839.

[54] Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. (2007). Salinityeffects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakilemaritima*.*Plant.PhysiolBioch*, 45: 244-249.

[55] Nijveldt R. J., Nood E., Hoorn D. E., Boelens P. G., NorrenK., Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am.J. ClinNutr*, 74 : p418–425.

[56] Kaufmann S.(1997). Host response to intracellular pathogens, Ed. Springer ; R.G. Landes, NewYork Austin, p. 345.

[57] Cowan M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents,ClinMicrobiol, Rev, 12: p 564-582.

[58] Asgarpanah J., and KazemivashN. (2012). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Coriandrumsativum*L. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 6(31): p 340-234.

[59] Pincemail J., Defraigne J.D. (2004). Les antioxidants un vaste réseau de defensespourlatter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire, Pro bioxSA. Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.

[60] Lamina S., Ezema C. I., Theresa A. I., and AnthoniaE. U.(2013). Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. Oxidants and Antioxidants inMedical Science, 2(2): p.83-91.

[61] Hazzit M. (2008). Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d"origan poussant en Algérie. Thèsedoctorat, USTHB, Alger, p 204.

[62] HoffmannD. (2003). Medical Herbalism : The Science and Practice of Herbal Medicine. Edition Inner Traditions / Bear& Co., p 90.

[63] Pincemail J., Degrune F., Voussure S., Malherbe C., Paquot N. &Defraigne J.-O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. Nutrition clinique et métabolisme,21:p 66–75.

[64]Chérifa BOUBEKRI . (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider – Biskra.

[65] Belaid., (2016). Conservation de la margarine par des extraits de grenade (*punica granatum L).*Thèse de master. Université de Bejaia.

[66] Ferrari,J.(2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidiainvolucrata*Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat, Université de Lausanne.

[67] Kholkhal,F. (2014). Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus*sspcoloratus et sspeuciliatus. Thèse de doctorat, UniversitéAbouBekrBelkaidTlemcen.

[68] Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F. &BrouillardR. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins.*Phytochemistry* ,64:p 923–933.

[69] KerioL.C., WachiraF. N., Wanyoko J. K. &RotichM. K. (2012).
Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. *Food Chemistry* ,131: p 31–38.

[70] ShippJ., et Abdel-Aal El-S. M. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients.The Open Food Science Journal, 4: p 7-22.

[71] VierlingE. (2008). Aliments et boissons : filières et produits. Wolters Kluwer France Edition, p 153.

[72] Roux D.,et CatierO. (2007). Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. Wolters Kluwer France Edition, p 74.

[73] HOFFMANN L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinatehydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.

[74] Sparg G.S., Light M.E., Van staden J. (2004). Biological activities and distridution of plantsaponine .Journal of Ethnopharmacology ,94:p 219-243.

[75]Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., and Becker K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. Br. J. Nutr, 88:p 587–605.

[76]Das T K., Banerjee D., Chakraborty D., Pakhira M C., Shrivastava B., Kuhad R C. (2012). Saponin: Role in Animal system. Vet. World, 5(4): p 248-254.

[77] Kren V and Martínková L (2001). Glycosides in Medicine: "The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity".Current Medicinal Chemistry,8: p 1303-1328.

[78] Vincken J.P., Heng L., De Groot A., GruppenH. (2007). Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry,**68**,:p 275–297

[79] ANTOLOVICH M., PRENZLER P., ROBARDS K., RYAN D. (2000).-Sample preparation in the analysis of phenolic compounds in fruits. Analyst, 125: p 989-1009.

[80] Luque de Castro, M.D.,et Garcia-Ayuso, L.E. (1998)."Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future." AnalyticaChimicaActa, 369: p 1-10.

[81] Handa S.S. (2008). An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and AromaticPlants.*In*: Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (Eds) Extraction Technologies,for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre For Science and High Technology,Trieste, Italy , p :21-54.

[82] Grigonis P.R., Venskutonis B., Sivik M., Sandahl D., et Eskilsson C.S. (2005). Comparison ofdifferent extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (Hierochloëodorata), The Journal of Supercritical Fluids, 33 (3): p 223-233.

[83] Wang L., et Weller C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticalsfromplants. Trends in Food Science and Technology, 17: p 300-312.

[84] Kiriamiti K.H. (2003). Extraction de pyréthrines par CO2 liquideetsupercritique, PhDThesis, INP Toulouse.

[85] Draye M., EstagerJ., Malacria M.,Goddard J.P., Ollivier C. (2009).Sonochimie Organique (K1250). Editions Techniques de l'Ingénieur, France.

[86] Benamor B. (2008). Maitrise de l'Aptitude Technologique de la Matière Végétale dans lesOpérations d'Extraction de Principes Actifs; Texturation par Détente Instantanée ContrôléeDIC. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle.

[87] Jawad,A., et Langrish,T.A.G. (2012). Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillardreaction.Journal of Food Engineering,109: p 162-174.

[88] Inoue T., Tsubaki S., Ogawa B., Onishi K., etAzuma J.I. (2010). Isolation of hesperidinfrom peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. Food Chemistry,123:p 542-547.

[89] Al-Harahsheh M. etKingman S.W. (2004). Microwave-assisted leaching-a review. Hydrometallurgy.,73(3-4) : p 189-203.

[90] Yeoh S., Shi J.,et Langrish T.A.G.(2008). Comparisons between different techniques forwaterbased extraction of pectin from orange peels.Desalination,218:p 229-237.

[91] Kratchanova M., Pavlova E. et Panchev I. (2004). The effect of microwave heating offresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. CarbohydratesPolymers,56 :p181-185.

[92] Mandal V., Mohan Y., et Hemalatha S. (2007). Microwave assisted extraction-Aninnovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy Reviews,1 :p 7-18.

[93] Reza T., Elham H., Ali B. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate(Punicagranatum .L) peel antioxidants by response surface methodology, Separation and Purification Technology, 98, p 16-3.

[94] Abbasi H., Karamatollah R., Emamdjomeh Z., Seyyed M., Ebrahimzadeh M. (2008).Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranateseedoil, ResearchPaper, University of Tehran, Karaj, Iran .

[95] Zhenbin W.,Zhongli P.(2011). Extract of PhenolicFromPomegranatePeels, The Open Food Science Journal,5, p 17-25.

[96] Ju Huang A .,Weiping He .,Chen Yan .(2017). Xihua Du and XiaoqinShi, microwave assisted extraction of flavonoids from pomegranate peel and its antioxidant activity article .

[97] Mahmoud Dif1 M et al.2014. First determination of polyphenol variation in *Daphne gnidium*L. leaves depending on altitude and slope at Tessala Mounts (North-West Algeria) Rev. Écol. (Terre Vie), vol, 69,p 340-341 .

[98] Ben Amor B. 2008. Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les Opérations d'extraction de principes actifs; Texturisation par détente instantanée contrôlée DIC. Thèse Doctorat, Université de la rochelle, France.

[99]Ghomari F; Bendi-Ouis A. 2007 – 2008.science des materiaux de construction, UniversiteAboubekrBelkaid,.

[100] Kujala T. S., Loponen J. M., Klika K. D., Pihlaja K.(2000) Phenolic and betacyanins in redbeet root (Beta vulgaris) root, distribution and effect of cold storage on the content of totalphenolics and threeindividual compounds, Food Chemistry, 48:p 5338-5342.

[101] Vuorela S. (2005). Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsink,.

[102] BessasLa rutine A. (2008). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le mielrécoltés dans le sud algérien, mémoire online, Université DjillaliLiabes -Sidi Bel Abbes.

[103] Ayoola G A.,Ipav S S et al. 2008. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of Allanblackiafloribundaoliv (Guttiferae), International journal of health research, 1 (2):p 81-93.

[104] Dohou N ., Yamni K. , et al. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéromarocaine, Thymelaealythroides, Bull. Soc, Pharm., Bordeaux, 142,p 61-78,.

[105] Boubekri,C(2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanummelongena par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, Université de Biskra, Alger.

[106] Brand-Williams W., Cuvelier M E., Berset C.(1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30 .

[107] Broadasky T. F., Lewis C., Eble T. E. (1976) Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal, I Clindamycin in the rat, J, Chromatogr, 123: p 33-44.

Annexes

Annexe I: Les Courbes d'étalonnages de l'acide gallique

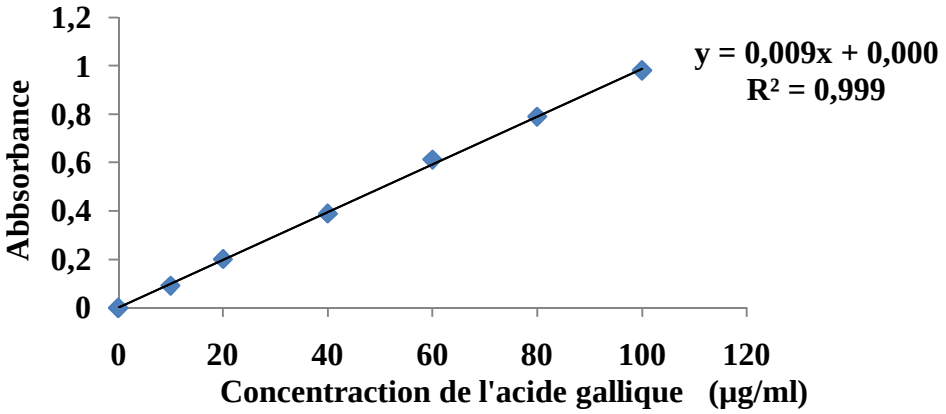


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique dans l'eau à 760nm

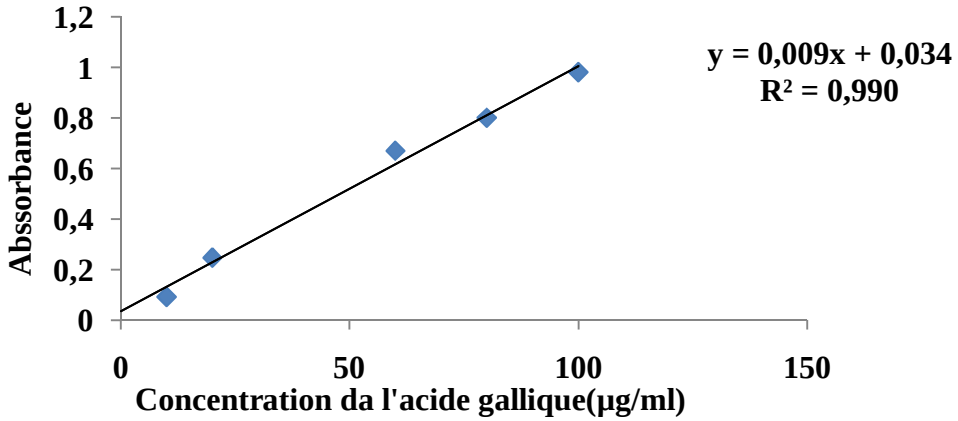


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique dans l'eau et l'éthanolà760nm

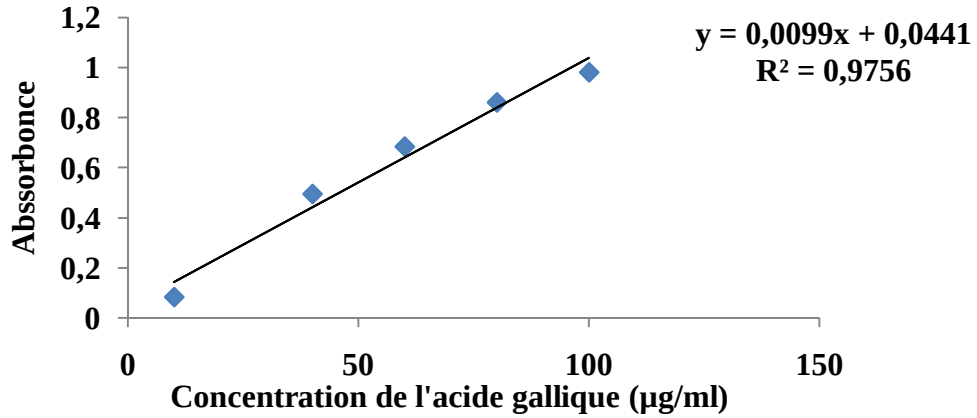


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique dans l'éthanol à760nm

Annexe II: Courbe d'étalonnage de rutine

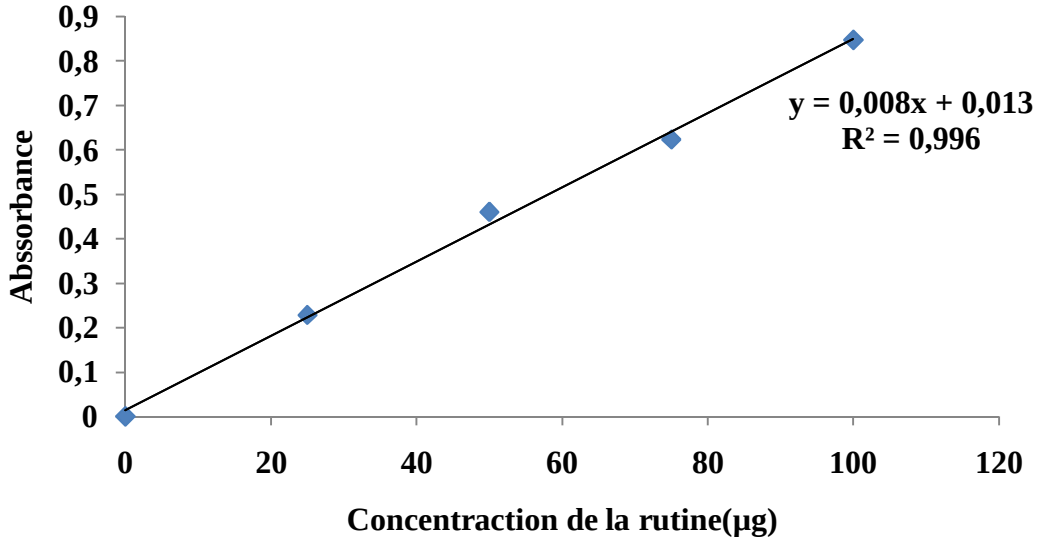


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de rutine dans l'éthanol à 430nm

Annexe III : Les matrices d'expériences avec les réponses

Tableau 1 : Matrice d'expériences avec les réponses de grenade 1

Exp N°	T(°C)	t(h)	Rapport S/L (g/ml)	N.S	dp (mm)	TPP (mgEAG/g)	TF (mgER /g)	TS (dyn/cm)
1	40	2	1/35	0	1	133.77	539.87	42.3
2	70	2	1/35	0	0,2	230.22	704.37	47.5
3	40	4	1/35	0	0,2	268.33	581	40
4	70	4	1/35	0	1	368.66	604.62	40.6
5	40	2	1/15	0	0,2	109.33	321	40
6	70	2	1/15	0	1	116.66	348	39.4
7	40	4	1/15	0	1	140.33	318	39.1
8	70	4	1/15	0	0,2	123.66	161.12	43.8
9	40	2	1/35	1	0,2	111.22	376.25	22.8
10	70	2	1/35	1	1	207.66	288.75	23
11	40	4	1/35	1	1	160.22	193.37	20,2
12	70	4	1/35	1	0,2	207.66	507.50	21,4
13	40	2	1/15	1	1	177.33	207.75	23
14	70	2	1/15	1	0,2	144.66	321	24,4
15	40	4	1/15	1	0,2	65	346.12	26,3
16	70	4	1/15	1	1	67	326.25	24,3
17	40	3	1/25	0,5	0,6	81.11	565.62	36.5
18	70	3	1/25	0,5	0,6	108.33	600.62	30,9
19	55	2	1/25	0,5	0,6	107.22	553.75	30.1
20	55	4	1/25	0,5	0,6	322.22	108.12	30,2
21	55	3	1/35	0,5	0,6	143.82	622.12	30,5
22	55	3	1/15	0,5	0,6	175.66	366.37	32
23	55	3	1/25	0	0,6	114.44	581.87	44
24	55	3	1/25	1	0,6	266.11	391.25	24
25	55	3	1/25	0,5	0,2	183.33	578.12	31.3
26	55	3	1/25	0,5	1	251.66	484.37	30,2
27	55	3	1/25	0,5	0,6	262.22	601.87	30.1

Tableau 2 : Matrice d'expériences avec les réponses de grenade 2

Exp No	T (°C)	t(h)	Rapport S/L(g/ml)	N.S	dp (mm)	TPP (mgEAG/g)	TF (mgER /g)	TS (dyn/cm)
1	40	2	1/35	0	1	287	437,5	46,0
2	70	2	1/35	0	0,2	147	482,12	48,0
3	40	4	1/35	0	0,2	129,88	420,87	43,4
4	70	4	1/35	0	1	142,33	490	41,8
5	40	2	1/15	0	0,2	54,66	274,5	39,5
6	70	2	1/15	0	1	97,33	326,25	43,3
7	40	4	1/15	0	1	136,98	306,37	43,7
8	70	4	1/15	0	0,2	151	294,75	46,8
9	40	2	1/35	1	0,2	154	159,25	23,2
10	70	2	1/35	1	1	194,44	280	23,7
11	40	4	1/35	1	1	430,88	131,25	23,0
12	70	4	1/35	1	0,2	188,22	489,12	23,9
13	40	2	1/15	1	1	72	202,87	23,4
14	70	2	1/15	1	0,2	69,33	186	21,9
15	40	4	1/15	1	0,2	109,66	169,5	24,4
16	70	4	1/15	1	1	168,66	151,5	24,2
17	40	3	1/25	0,5	0,6	359,33	376,25	35,2
18	70	3	1/25	0,5	0,6	136,66	408,75	32,3
19	55	2	1/25	0,5	0,6	233,33	419,37	33,0
20	55	4	1/25	0,5	0,6	189,77	399,37	33,5
21	55	3	1/35	0,5	0,6	388,88	418,25	31.5
22	55	3	1/15	0,5	0,6	265,33	344,62	33,5
23	55	3	1/25	0	0,6	96,66	412,5	54,0
24	55	3	1/25	1	0,6	338,58	174,37	23,5
25	55	3	1/25	0,5	0,2	103,33	426,87	30,1
26	55	3	1/25	0,5	1	232,22	425	30,0
27	55	3	1/25	0,5	0,6	197,55	436,875	29,4

Tableau 3 : Matrice d'expériences avec les réponses de *daphne gnidium*

Exp N°	T (°C)	t (h)	rapport S/L (g/ml)	N.S	dp (mm)	TPP (mgEAG/g)	TF (mgER /g)	TS (dyn/cm)
1	40	2	1/35	0	1	333,66	76,12	43,6
2	70	2	1/35	0	0,2	574,55	84,87	40,4
3	40	4	1/35	0	0,2	101,11	105,87	46,8
4	70	4	1/35	0	1	350,77	104,12	45,0
5	40	2	1/15	0	0,2	114,60	93,37	49,4
6	70	2	1/15	0	1	126	91,5	41,2
7	40	4	1/15	0	1	96,33	120,7	44,7
8	70	4	1/15	0	0,2	192,34	146,25	48,9
9	40	2	1/35	1	0,2	43,55	160,12	22,3
10	70	2	1/35	1	1	469	79,62	22,1
11	40	4	1/35	1	1	332,88	123,37	23,2
12	70	4	1/35	1	0,2	210,77	257,24	22,9
13	40	2	1/15	1	1	23	57	23,5
14	70	2	1/15	1	0,2	234	177,37	25,9
15	40	4	1/15	1	0,2	245	226,12	24,4
16	70	4	1/15	1	1	195	181,12	25,0
17	40	3	1/25	0,5	0,6	134,4	81,25	37,3
18	70	3	1/25	0,5	0,6	342,77	380,62	30,4
19	55	2	1/25	0,5	0,6	259,44	272,50	29,5
20	55	4	1/25	0,5	0,6	213,88	105	30,5
21	55	3	1/35	0,5	0,6	231	216,12	30,4
22	55	3	1/15	0,5	0,6	124,66	202,87	30,5
23	55	3	1/25	0	0,6	185	225	48
24	55	3	1/25	1	0,6	59.44	195	23,7
25	55	3	1/25	0,5	0,2	262,22	246,875	30,5
26	55	3	1/25	0,5	1	218,88	191,25	30,0
27	55	3	1/25	0,5	0,6	189,44	166,87	33,6