République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Génie des Procédés

Option : Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème

Caractérisation des extraits des écorces de grenade obtenus par différentes techniques d'extraction

Proposé et dirigé par :

Dr. KHALLADI .R
Dr. CHERIFI. H

Réalisées par :

AMARI Nesrine
MOHAMEDE SEGHIR Siham

Membres de Jury :

Dr. ZOUAMBIA. Y	MCA, U. de Médéa	**Présidente**
Dr. SEDDARI. S	MCB, U. de Médéa	**Examinatrice**

2016 / 2017

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut… Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance… Aussi, c'est tout simplement que

Je dédie cette mémoire …

A mes chers parents Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive

A mon très Cher Petit Poussin Mouhamed , C'est à toi mon adorable ange, ma joie, mon petit trésor que maman dédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Je t'aime mon bébé et je te souhaite tous le bonheur du monde.

A mon mari Khaled pour son soutien et sa compréhension qui n'a jamais cessé de croire en moi Source d'amour et de tendresse,Sans toi cette thèse n'aurait jamais vu le jour…

A mes sœurs : Imene et Wessame et mon frère Akrem qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité

A mes camarades de promotion que je n'oublierai jamais les moments passés

avec eux. Ainsi mon binôme Siham

Au bonheur des plus chers.

Je dédie ce modeste travail.

A la fin, à tous ceux que j'ai n'est pas cité.

AMARI Nesrine

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut… Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance… Aussi, c'est tout simplement que

Je dédie cette mémoire …

A mes chers parents Ahmad et Djamila Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive

A mes sœurs :Lynda et Lamia et mon frère Rayan et Tamer qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité

A mon futur mari Soufiane pour son soutien et sa compréhension qui n'a jamais cessé de croire en moi Source d'amour et de tendresse, Sans toi cette thèse n'aurait jamais vu le jour…

A mes camarades de promotion que je n'oublierai jamais les moments passés avec eux.

Ainsi mon binôme Nesrine

Au bonheur des plus chers.

Je dédie ce modeste travail.

A la fin, à tous ceux que j'ai n'est pas cité.

MOHAMED SEGHIR SIHAM

Remerciements

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à **Allah** tout puissant qui nos donnes la sante, la volante, le courage, et la patience de réaliser ce travail.

Nous remercions promotrice : Dr .Khalladi. R pour leur aide, leurs conseils judicieux et encouragements. Sans lesquels ce travail n'aurait pas voir la lumière

Sans oublier Co- promotrice Dr. Cherifi .H pour son encadrement et leurs conseils.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance aux membres du jury Dr. Zouambia Y ainsi que Dr. Seddari S qui nous font l'honneur de juger ce travail.

Nous tenons également à remercier toute l'équipe des enseignants de l'université Yahia Fares de Médéa qui nous ont guidés tout au long de notre vie universitaire.

Nous sommes très reconnaissantes envers le directeur de laboratoire de recherche qui nos ont accueillies au sein de leur laboratoire.

Nous tiens à remercier tout l'ensemble du personnel du hall technologique de l'université de MEDEA ainsi que celle du laboratoire de chimie II et labo de Génie Civil.

Nous remercions le directeur de laboratoire de la Direction de la santé et de la population au niveau de Médéa.

Nous remercions enfin toutes personnes qui participent pour réaliser ce travail.

ملخص :

نتحدث في هذه الدراسة عن استخلاص المركبات النشطة بيولوجيا من المادة النباتية التي تتميز بالخصائص العلاجية, ألا وهي الرمان, إن استخراج المركبات الفينولية من قشور الرمان تتم باستعمال طريقتين هما : استخلاص بمذيب مع التسخين واستخلاص بالمكروأوند. لقد تم دراسة تأثير العوامل: طبيعة المذيب درجة الحرارة , الكسر كتلة الصلب/حجم المذيب قطر الجسيمات ومدة الاستخلاص على مردود الاستخلاص والمحتوى من مادة البونيفيولات الكلية والفلافونويدات. وكذلك تمت دراسة النشاط المضاد للجراثيم , النشاط المضاد للأكسدة وغيرها من الخصائص الفزيوكيماوية لمستخلص الرمان. أظهرت النتائج أن الرمان من منطقة المدية يحتوي على السابونين والبوليفينول . لقد تم الحصول على 783.89 (مغ مكافئ حمض الڤاليك / غ مادة الجافة) من مادة البوليفينولات الكلية و466.07 (مغ مكافئ حمض الروتين/ غ مادة الجافة) من الفلافونويدات مع الإيثانول 50 ٪ في ظل الظروف : 40 درجة مئوية, الكسر 1/15 كتلة الصلب/حجم المذيب, قطر الجسيمات 0.08 مم و مدة الاستخلاص 3 سا باستعمال طريقة استخلاص بمذيب مع التسخين. و تحت نفس الظروف تم الحصول على 582.44 (مغ مكافئ حمض الڤاليك / غ مادة الجافة) من مادة البوليفينولات الكلية و341.30 (مغ مكافئ حمض الروتين / غ مادة الجافة) من الفلافونويدات مع الإيثانول 50 ٪ بواسطة الاستخلاص بالمكروأوند. ان كل من مستخلصات الماء ,الإيثانول و الإيثانول 50٪ أظهرت نشاطا ملحوظا مضادا للأكسدة و مضادا للمكروبات مع قيم مقبولة للتركيز الادنى للتثبيط .

كلمات المفتاحية : الرمان , المركبات الفينولية ، الاستخلاص ، الخصائص البيولوجية.

Résumé :

Dans cette étude on traite de l'extraction des composés bioactifs à partir d'une matière végétale caractérise par des pouvoirs thérapeutiques multiples ; à savoir la Grenade. L'extraction des composés phénoliques à partir des écorces de grenade a été effectuée par deux méthodes qui sont : l'extraction par solvant à chaud (ESC) et l'extraction par micro-onde (MO). L'effet des paramètres : nature du solvant, température (T), rapport solide/liquide (s/l), diamètre des particules (dp) et temps de l'extraction (t) sur le rendement de l'extraction et la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes a été étudié. L'activité antimicrobienne, et l'activité antioxydante, ainsi que d'autres propriétés physico-chimiques de l'extrait de grenade ont été étudiées. Les résultats obtenus montrent que la grenade variété de Médéa contient des saponines et des polyphénols. Une teneur de 783.89 (milligramme Equivalant Acide gallique /gramme de matière sèche) de polyphénols totaux et 466.07 (milligramme Equivalant Rutine /gramme de matière sèche) de flavonoïdes ont été obtenues avec l'éthanol 50% sous les conditions : T=40°C, s/l= 1/15, t=3h et dp = 0.08 mm par la méthode extraction par solvant à chaud. Sous les mêmes conditions, 582.44 (mg EAG/g) de polyphénols totaux et 341.30

(mg ERU/g) de flavonoïdes ont été obtenues avec l'éthanol 50% par l'extraction par micro-onde. Les extraits d'eau, d'éthanol et d'éthanol 50% ont tous montrés une remarquable activité antioxydante et activité antimicrobienne avec des valeurs acceptables de concentration minimale d'inhibition.

Mots clés: Grenade, composés phénoliques, extraction, propriétés biologiques.

Abstract:

In this study we treat about extraction of bioactive compounds from a vegetal material known by its valuables therapeutic activities; it is the Pomegranate. The extraction of phenolic compounds from pomegranate peels was carried out by two methods: hot extraction with solvent and microwave extraction. The effect of the parameters: type of solvent, temperature (T), solid/liquid ratio (S/L), particle size (dp) and the extraction time (t) on the extraction yield and the content of total polyphenols and flavonoids was studied. The antimicrobial and antioxidant activities and other physicochemical properties of the pomegranate extract were examined. The results show that pomegranate of Medea contains saponins and polyphenols. 783.89 (mg EAG/g) of total polyphenols and 466.07 (mg ERU/g) of flavonoids were obtained with ethanol 50% under the conditions: T = 40°C, s/l=1/15, dp= 0.08mm and t=3h with hot solvent extraction. Under the same conditions, 582.44 (mg EAG/g) of total polyphenols and 341.30(mg ERU/g) flavonoids were obtained with ethanol 50% using microwave extraction. The extracts of water, ethanol and ethanol 50% showed a remarkable antioxidant and antimicrobial activities with a significant minimal inhibition concentration values.

***Keywords*:** Pomegranate, phenolic compounds, extraction, Biological properties.

Table des matières

Dédicace……..……..…i

Remerciements……..……...…ii

Résumés (arabe, français et anglais)……...……...……..iii

Table des matières ……...……...……v

Abréviations x

Liste des tableaux……..……..…….…....xii

Liste des figures……...……...……..…xiii

INTRODUCTION GENERALE…….…….1

CHAPITRE. I GENERALITE SUR LA GRENADE

I.1 HISTORIQUE 2

I.2 GÉNÉRALITÉS SUR LA GRENADE.....2

I.2.1 Description du grenadier et ses composantes……..…….2

I.2.1.1 Grenadier……...……...…….2

I.2.1.2 Fruit grenade.....3

I.2.1.3 Ecorce de grenade et son importance.....4

I.2.2 Etymologie et nomenclature.....4

I.2.3 Classification botanique.....5

I.3 ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU GRENADIER.....6

I.3.1 Origine géographique du grenadier.....6

I.3.2 Aire de répartition géographique du grenadier.....6

I.3.3 Le grenadier en Algérie.....6

I.3.4 Cultivations du grenadier.....7

I.3.5 Composition chimique du grenadier.....8

I.4. GENERALITES SUR LES POLYPHENOLS.....9

I.4.1 Définition.....9

I.4.2 Structure des composés phénoliques.....10
I.4.3 Classification des polyphénols.....11
I.4.3.1 Flavonoïdes.....11
I.4.3.2 Acides phénoliques.....12
I.4.3.3 Tanins.....13
I.4.3.4 Stilbènes.....13
I.4.3.5 Lignanes.....14
I.4.3.6 Saponines.....14
I.5. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DE LA GRENADE.....14
I.5.1 Activité antioxydante 15
1.5.2 Activité anti-inflammatoire.....15
I.5.3 Activité anticarcinogénique.....16
I.5.4 Activité antimicrobienne.....16
I.5.5 Autres effets de la grenade sur la santé.....16
I.6. UTILISATION DU GRENADIER DANS L'INDUSTRIE.....17
I.6.1 Industrie agroalimentaire.....17
I.6.2. Industriecosmétique.....17
I.6.3 Autres usages industriels.....17

CHAPITRE .II METHODES D'EXTRACTIONS

II.1 EXTRACTION SOLIDE LIQUIDE DES POLYPHENOLS.....18
II. 2 METHODES D'EXTRACTION CONVENTIONNELLES 18
II.2.1 Infusion.....18
II.2.2 Décoction 19
II.2.3 Macération 19
II.2.4 hydro-distillation et entrainement à la vapeur 19
II.2.5 Extraction par Soxhlet.....20
II.3 METHODES D'EXTRACTION INNOVANTES 21

II.3.1 l'extraction par fluide supercritique 21
II.3.2 Extraction assistée par ultrasons.....22
II.3.3 Extraction assistée par micro-ondes.....22
II.4 PRINCIPAUX PARAMETRES DE L'EXTRACTION SOLIDES-LIQUIDE.....23
II.4.1 Température 23
II.4.2 Rapport solvant / solide 23
II.4.3 Temps d'extraction 24
II.4.4 Nature du solvant 24
II.4.5 Agitation mécanique.....24
II.4.6 Taille des particules 25
II.4.7 pH du milieu.....25
II.5 RESUME DE QUELQUES TRAVAUX EFFECTUES SUR L'EXTRACTION DU GRENADIER …….25

CHAPITRE. III MATERIELS ET METHODES

III.1 MATERIELS ET PRODUITS 27
III.2 PROTOCOLE EXPERIMENTALE.....28
III.2.1 Préparation du matériel végétal.....28
III.2.2 Préparation de la poudre de grenade.....28
III.2 CARACTERISATION DU MATERIEL VEGETAL.....29
III.2.1 Détermination de la teneur en eau.....29
III.2.2 Détermination du diamètre moyen de la poudre de grenade.....29
III.2.3 Caractéristiques organoleptiques 29
III.3 PROCEDURE D'EXTRACTION 30
III.3.1 Extraction par solvant à chaud (ESC).....30
III.3.2 Extraction par micro-onde (MO).....31
III.4 RECUPERATION DE L'EXTRAIT LIQUIDE.....32

III.4.1 Filtration 32

III.4.2 Centrifugation 32

III.4.3 Rota-évaporation des extraits éthanoïques.....32

III.5 RENDEMENT D'EXTRACTION PAR ESC.....33

III.6 CARACTERISATION DE L'EXTRAIT DE GRENADE 33

III.6.1 Caractère organoleptique.....33

III.6.2 Test de présence d'agent tension active.....33

III.6.2.1 Test de moussage 33

III.6.2.2 Mesure de la tension superficielle 34

III.7 DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES 35

III.7.1 Principe spectrométrie UV – Visible 35

III.7.2. Dosage des polyphénols totaux 35

III.7.3 Dosage des flavonoïdes totaux.....37

III.8 ACTIVITE ANTIOXYDANT 38

III.9 ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....39

CHAPITRE. IV RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1 TENEUR EN EAU DES ECORCES DE GRENADE 43

IV.2. CARACTERISATION DE LA POUDRE DES ECORCES DE GRENADE 43

IV.2.1 Caractère organoleptique 43

IV.2.2 Diamètre moyen de la poudre de grenade.....44

IV.3 CARACTERISTIQUES DES EXTRAITS DE GRENADE.....45

IV.3.1 Caractère organoleptique 45

IV.3.2 Présence des substances tensioactives dans l'extrait de grenade 46

IV.3.3 Teste de la tension superficielle 47

IV.4 ETUDE PARAMETRIQUE DE L'EXTRACTION.....48

IV.4.1 Effet du diamètre des particules.....48

IV.4.2 Effet de la température.....49

IV.4.3 Effet du rapport (s/l) et du temps d'extraction.....49

IV.5 DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX.....50

IV.5.1 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique 50

IV.5.2 Effet du rapport solide/liquide.....51

IV.5.3 Effet de la température 52

IV.5.4 Effet du diamètre des particules de grenade 54

IV.5.5 Effet de temps 54

IV.6 DOSAGE DES FLAVONOÏDES.....55

IV.6.1 Courbe d'étalonnage de la rutine.....55

IV.6.2 Effet du rapport solide/liquide.....56

IV.6.3 Effet de la température.....57

IV.6.4 Effet du diamètre des particules de grenade 57

IV.6.5 Effet de temps 58

IV.7 COMPARAISON PAR DEUX METHODES D'EXTRACTION ESC ET MO.....59

IV.7.1 Effet du solvant et du rapport s/l pour dosage des polyphénols totaux 59

IV.7.2 Effet du solvant et du rapport s/l pour dosage des flavonoïdes.....61

IV.8 ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE GRENADE..63

IV.8.1 Test de sensibilité des souches bactériennes aux extraits de grenade 63

IV.8.2 Détermination de la CMI 64

IV.9 ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....69

CONCLUSION GENERALE…….....71

Références bibliographiques.....73

Liste des Abréviations et symboles

Abréviation	Signification
°C	Degré Celsius
µg	microgramme
µm	micromètre
Abs	Absorbance.
AG	Acide gallique
APG	Angiosperms Phylogeny Group
ATCC	American type culture collection
CI_{50}	Concentration inhibitrice 50 %
Cm	Centimètre
CMC	concentration de micellisation critique
CMI	La concentration minimale inhibitrice.
d_p	diamètre de pore
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
EAG	Equivalant
EFS	Extraction par fluide supercritique
ES	Extraction par Soxhlet
ESC	Extraction par solvant à chaud
EU	Extraction par ultrason
G	Gramme
H	Heurs
I	Inhibition
L	Litre
m_{ext}	masse de l'extrait après évaporation du solvant
Min	Minute

Ml	Millilitre
Mm	Millimètre
MO	Extraction par Micro-onde
m_p	masse de la poudre de l'échantillon végétal
mPa	Unité de pressions milli Pascal
Na_2CO_3	Bicarbonate de sodium
Nm	Nanomètre
PH	Potentiel d'Hydrogène
R	Rendement
RU	Rutine
s/l	Solide/liquide
T	Temperature
t	Temps
TF	La teneur en flavonoïdes
Tp	La teneur en polyphénols totaux
UV	Ultraviolet.
v_s	Volume de solvants

Liste des tableaux

Tableau	Titre du tableau	Page
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA GRENADE		
Tableau I.1	Liste des variétés des espèces de grenadier en Algérie	7
Tableau I.2	Composition nutritionnelle de la partie comestible	8
Tableau I.3	Composition en polyphénols des différentes parties du grenadier	9
CHAPITRE II : METHODES D'EXTRACTIONS		
Tableau II.1	Résumé de quelques travaux effectués sur l'extraction du grenadier	26
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES		
Tableau III.1	Matériel et produites utilisés	27
Tableau III.2	Conditions opératoires de l'extraction par solvant à chaud	30
Tableau III.3	Conditions opératoires de l'extraction par micro-onde	31
Tableau III.4	Microorganismes étudiés	40
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS		
Tableau IV.1	Résultats de mesure de l'humidité des écorces de grenade	43
Tableau IV.2	Caractéristiques organoleptiques de la poudre de grenade	43
Tableau IV.3	Caractéristiques organoleptiques des extraits de grenade par ESC	46
Tableau IV.4	Caractéristiques organoleptiques des extraits de grenade par micro-onde	46
Tableau IV.5	Hauteurs de la mousse dans les extraits de grenade	47
Tableau IV.6	Tension superficielle des extraits de grenade	48
Tableau IV.7	Rendements d'extraction à différent diamètre des particules	48
Tableau IV.8	Rendements d'extraction à différent température	49
Tableau IV.9	Rendements d'extraction pour différent rapport (s/l)	50
Tableau IV.10	Rendements d'extraction pour différent temps	50
Tableau IV.11	Test de sensibilité des souches étudiées aux extraits de grenade	63
Tableaux IV.12	Valeur de la CMI (mg/ ml) des extraits de grenade	68

Liste des figures

Figure	Titre de la figure	Page
CHAPITRE : GENERALITES SUR LA GRENADE		
Figure I.1	Le grenadier	3
Figure I.2	Le fruit grenade et ses différentes parties	3
Figure I.3	Répartition géographique de la grenade en Afrique, France et Amérique du nord	6
Figure I.4	Classification de quelques métabolites secondaires	10
Figure I.5	Structure de base des flavonoïdes	11
Figure I.6	Les structures chimiques de la rutine et de la quercetine	12
Figure I.7	Structure de l'acide gallique	12
Figure I.8	Acide hydroxycinnamique (acide caféique)	13
CHAPITRE II : METHODES D'EXTRACTIONS		
Figure II.1	Schéma de l'hydro-distillation	20
Figure II.2	Distillation traditionnelle des fleurs de roses	20
Figure II.3	Schéma de l'extracteur Soxhlet	21
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES		
Figure III.1	Préparation de la matière végétale	28
Figure III.2	a) Mortier ; b) Moulin à poivre ; c) Poudre de grenade	28
Figure III.3	Série de tamis et tamiseuse	29
Figure III.4	Extraction par solvant à chaud	30
Figure III.5	Micro-onde	31
Figure III.6	Etapes de récupération de l'extrait.	32
Figure III.7	le rota-vapeur (évaporateur rotatif)	33
Figure III.8	Schémas du tensiomètre de LECOMPTE DU NOUY	34

Figure III.9	Effet de la montée de l'anneau sur la surface du liquide	34
Figure III.10	Spectrophotomètre UV-vis	35
Figure III.11	Différentes étapes de dilution	41
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS		
Figure IV.1	Diamètre moyen de la poudre du broyage	44
Figure IV.2	Images des particules de poudre, 4x0.1	45
Figure IV.3	Extraits de grenade par : (A) Micro-onde; (B) Solvant à chaud	45
Figure IV.4	Test de moussage	46
Figure IV.5	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique à 760 nm	51
Figure IV.6	Effet du rapport solide/liquide sur l'extraction des polyphénols totaux	52
Figure IV.7	Effet de la température sur l'extraction des polyphénols totaux	53
Figure IV.8	Effet du diamètre des particules sur l'extraction des polyphénols totaux	54
Figure IV.9	Effet du temps sur l'extraction des polyphénols totaux	55
Figure IV.10	Courbe d'étalonnage de la rutine à 430 nm.	55
Figure IV.11	Effet du rapport solide/liquide sur l'extraction des flavonoïdes	56
Figure IV.12	Effet de la température sur l'extraction des flavonoïdes	57
Figure IV.13	Effet du diamètre des particules sur l'extraction des flavonoïdes	58
Figure IV.14	Effet du temps sur l'extraction des flavonoïdes	59
Figure IV.15	Effet du solvant sur l'extraction des polyphénols par deux méthodes.	60
Figure IV.16	Effet du rapport solide/liquide sur l'extraction par ESC et MO	60
Figure IV.17	Effet du solvant sur l'extraction des flavonoïdes par ESC et MO	61
Figure IV.18	Effet du rapport sur l'extraction des flavonoïdes par ESC et MO	62
Figure IV.19	Test de diffusion pour l'extrait d'eau (**H**) d'éthanol (**E**) et d'éthanol 50% (**5**) sur *Staphylococcus aureus*.	64
Figure IV.20	Test de diffusion pour l'extrait d'eau (H) d'éthanol (E) et d'éthanol 50% (**5**) sur *Escherichia coli*.	65
Figure IV.21	Test de diffusion pour l'extrait d'eau (H) d'éthanol (E) et d'éthanol 50% (5) sur *Candida albicans*.	65

Figure IV.22	Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait d'éthanol 50%	66
Figure IV.23	Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait d'eau.	66
Figure IV.24	Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait d'éthanol.	67
Figure IV.25	Activité antioxydant des extraits d'écorces de grenade	69

Introduction générale

De jour en jour, les substances naturelles connaissent un intérêt grandissant dans de nombreux domaines. En effet, avec un public de plus en plus réticent et cherchant à consommer des produits « BIO » issus de traitement chimique à partir des déchets de matières végétales, plusieurs secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'extraction de molécules bioactives d'origine naturelle, ayants des caractéristiques physico-chimiques et biologiques appréciables. La valorisation des déchets de fruits et légumes issues des différentes industries afin de produire des composés actifs d'origine naturelle représente donc un potentiel économique et environnemental énorme.

La grenade, fruit consommé depuis des millénaires, connaît un regain d'intérêt sans précédent à la fois auprès des scientifiques et des consommateurs. En effet, ce fruit, en plus de sa grande valeur nutritionnelle, constitue une source importante de minéraux, de vitamines et surtout de polyphénols. Ces composés phénoliques regroupent essentiellement les tanins, les anthocyanes et les flavonoïdes, dont les propriétés antioxydants, anti-inflammatoires, antiprolifératives sont très intéressantes. L'utilisation médicinale de la grenade est très ancienne, mais ces deux dernières décennies, de nombreux travaux ont été réalisés sur les écorces de ce fruit, qui se sont montrées comme une source remarquable de composés phénoliques [1].

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail se focalise sur l'étude de l'extraction des polyphénols à partir des écorces de grenade par deux méthodes; à savoir : une méthode classique qui est l'extraction par solvant à chaud, et par une méthode innovante qui est l'extraction assistée par micro-onde. Les extraits des écorces de la grenade fruit du grenadier obtenus sous différentes conditions ont été caractérisés par le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes et la mesure de l'activité antioxydant et antimicrobienne, ainsi que l'activité tensioactive.

La présente étude est axée sur quatre chapitres :

- Le premier chapitre présente des généralités sur le grenadier et ses constituants bioactifs ; à savoir : les composés phénoliques.
- Le deuxième chapitre résume les méthodes d'extractions les plus utilisées sur le fruit grenade et ces différentes parties, ainsi que les paramètres d'extraction les plus influents
- Le troisième chapitre est consacré aux matériels et méthodes utilisés dans ce travail.
- Le quatrième chapitre présente les résultats obtenus ainsi que les interprétations proposées.

Chapitre I : Généralités sur la Grenade

I.1 HISTORIQUE

La pomme grenade vient de la Perse, apparu d'abord sous la forme pume grenate en 1175, le terme « grenade » a fait son apparition dans la langue française en 1314. IL vient du Latin malum granatum qui signifie « fruit à petits grains ».L'actuel nom Latin punica vient de ce que les Romains appelaient également le fruit Punicum malum, littéralement « pomme punique » [2 - 3].

La grenade a constitué, très tôt dans l'histoire, un des aliments de base des voyageurs et des caravaniers. Sa pulpe gorgée d'eau et légèrement acidulée permettait d'étancher la soif durant les longues traversées du désert. Ses pépins se sont donc rapidement disséminés vers l'est (Afghanistan, Inde, Chine) et vers l'ouest (Égypte).

En Asie, ainsi que dans la Grèce et la Rome antiques, elle revêt diverses autres significations dans les 3 grandes religions monothéistes: nostalgie de la terre promise pour les Hébreux en exil, symbole des perfections divines pour les chrétiens, antidote contre la haine et l'envie chez les musulmans [4].

Aujourd'hui, les vertus attribuées au jus de grenade par les médecines ancestrales sont confirmées et explicitées par la science contemporaine. La Société Française des Antioxydantes énumère de façon détaillée les multiples effets bénéfiques des polyphénols antioxydantes de la grenade: « Utilisée historiquement pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires, la grenade attire depuis quelques années l'attention des scientifiques en tant qu'agent protecteur contre les maladies cardio-vasculaires et le cancer » [5].

I.2 GÉNÉRALITÉS SUR LA GRENADE

I.2.1 Description du grenadier et ses composantes

I.2.1.1 Grenadier

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux [6]. (Figure I.1). Il est depuis longtemps cultivé à but ornemental et pour ses fruits comestibles. Actuellement, la grenade est cultivée dans la plupart des régions à climat chaud, car il a besoin de fortes chaleurs pendant toute la

période de fructification [7]. La récolte des fruits se fait à l'automne, mais on peut désormais en acheter toute l'année dans la plupart des épiceries.



Figure I.1 : Le grenadier

I.2.1.2 Fruit grenade

La grenade, que l'on appelle parfois pomme grenade, est une grosse baie ronde de diamètre atteignant 15 centimètres à écorce dure et coriace, de couleur passant avec le temps du vert au rouge orange et ou jaune-beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit (Figure I.2). Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre. En tout il y a à peu près 400 graines dans chaque fruit [8 - 9].



Figure I.2 : Le fruit grenade et ses différentes parties [10].

I.2.1.3 Ecorce de grenade et son importance

L'écorce du fruit du grenadier également appelée *malicorium* est la partie dure du fruit. L'écorce et la membrane blanche représentent environ 50% du poids total de la grenade [10]. Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtres sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées. Ces fragments sont de consistance coriace. Ils sont formés d'un parenchyme de cellules à parois minces, au milieu desquelles on distingue des groupes de cellules pierreuses et des faisceaux fibro-vasculaires. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente [11].

Depuis des milliers d'années, les propriétés astringentes de l'écorce du fruit et de l'arbre sont très prisées en médecine, particulièrement comme vermifuge. Un grenadier peut fournir jusqu'à 1kg d'écorce de grenade séchée par an [6]. Ces derniers sont une source très importante de composés bioactifs tels les polyphénols, et les minéraux, essentiellement du potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium.

I.2.2 Etymologie et nomenclature

Etymologiquement le grenadier appelé *Punica granatum,* Punica en souvenir des guerres puniques ou peut-être pour puniceus qui signifie rouge écarlate en latin, et granatum pour la multiplicité des graines contenues dans le fruit. Cependant, le fruit grenade porte quelque fois les noms français de : Pomme grenade, Pomme vénitienne, Pomme de Carthage, Balauste, Miougane ,Arosse, Granate,Migrane. De même, la fleur du grenadier est également appelée balauste . Quant au mot *malicorium*, il désigne l'écorce du fruit du grenadier [11].

Dans le monde, la grenade est connue par plusieurs noms communs; parmi eux on cite.

- Nom arabe : Romane
- Nom français : grenadier « Fruit: Grenade»
- Nom anglais : pomegranate ou Pome Granate.
- Nom espagnol : Granado coltivado, Mangrano
- Nom italien : Melograno , Granato.
- Nom Inde : Anaar, Dadima. [6 - 7 - 12].

I.2.3 Classification botanique

Le grenadier, Punica granatum, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753, telle est cette classification [13]:

- Embranchement : Spermaphytes.
- Sous-embranchement : Angiospermes.
- Classe : Magnoliopsida.
- Ordre : Myrtales.
- Famille : Punicaceae.
- Genre : Punica.
- Espèce : Punica granatum.

Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII (Angiosperms Phylogeny Group), qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est [6 - 13]:

- Classe : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones vraies
- Classe : Rosidées
- Ordre : Myrtales
- Famille : Lythraceae
- Genre : Punica
- Espèce : Punica granatum

Il convient donc de retenir que dans cette nouvelle classification, la famille des Punicacées n'existe plus. Et que le grenadier appartient à la famille des Lythracées, famille comportant 30 genres et 600 espèces [13]. Que ce soit dans la classification de Linné ou dans la classification APGII, le genre Punica ne possède que deux représentants: Punica granatum, d'une part, et Punica protopunica, d'autre part. Ce dernier est recensé exclusivement sur l'île de Socotra ou Socotora, située dans l'océan Indien, au large des côtes de Somalie [14].

I.3 ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU GRENADIER

I.3.1 Origine géographique du grenadier

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontané depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III^{ème} [15].

C'est dans l'ancienne Perse que débuta la culture du grenadier et c'est également de la Perse que le grenadier fut importé en Occident, sur les pourtours du bassin méditerranéen de l'Europe et de l'Afrique du nord. En effet, la plante fut introduite à Rome à la fin des guerres puniques, rapportée par les Romains après leur victoire sur les Carthaginois [16].

I.3.2 Aire de répartition géographique du grenadier

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc. De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique (figure I.3) [6].

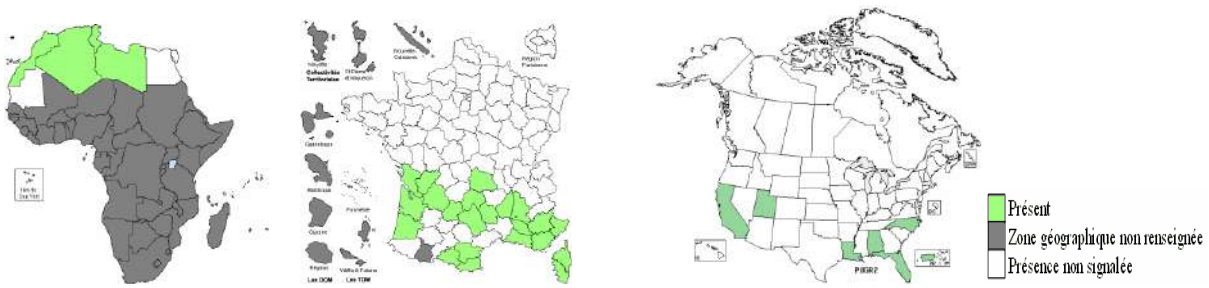


Figure I.3 : Répartition géographique de la grenade en Afrique, France et Amérique du nord [6].

I.3.3 Le grenadier en Algérie

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations de ce fruit en Algérie ne sont pas très importantes [17].

En Algérie il existe 14 variétés homologuées de grenadier cité dans le tableau (I.1). Parmi elles, seulement 4 variétés sont réellement utilisées. Selon l'Institut National de la recherche Agronomique d'Algérie, plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardins et

vergers dans le payé, on ne connait que leur appellation locale (lahlou, Elmouze, Elqares,……) [17].

Tableau I.1 : Liste des variétés des espèces de grenadier en Algérie [16].

Corda travita 	Sefri 
Moller Huesso 	Chelfi 
Mellisse 	Messaad 
Papersshell 	Doux de kolea
Sulfani	Zemdautomme
Espagne rouge	Gajin
Spanish duoy	Sélection station

I.3.4 Cultivation du grenadier

Le grenadier est bien adapté au climat méditerranéen et aux zones arides. Il est très résistant et s'acclimate très bien dans de nombreux milieux. Les meilleurs fruits sont obtenus dans les régions subtropicales, où la période des températures élevées concorde avec la maturité des grenades. L'espèce exige une petite dose de froid en période hivernale pour son évocation florale, mais il craint les conditions généralement froides des hautes altitudes [18].

Le grenadier s'adapte à une large gamme de sols et tolère les terrains acides, alcalins, crayeux… Il est également assez résistant à la salinité de la terre [6]. Donc le grenadier doit avoir « les pieds dans l'eau et la tête au soleil ».

I.3.5 Composition chimique du grenadier

Le grenadier possède dans ses différentes parties de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée: écorce, membranes blanches, arilles et graines. Les composés chimiques majoritaires de ce fruit sont les polyphénols et d'autres composés tels que les alcaloïdes, les sucres, les lipides, les acides aminés, les stéroïdes et les sels minéraux (tableau I.2) [19].

Tableau I.2 : Composition nutritionnelle de la partie comestible [20].

Nutriment	Unité	Valeur pour 100g	Valeur pour 1Fruit=282g	Nutriment	Unité	Valeur pour 100g	Valeur pour 1Fruit=282g
Principaux composés				**Minéraux**			
Eau	g	77.93	219.76	Calcium (Ca)	Mg	10	28
Energie	Kcal	83	234	Fer, (Fe)	Mg	0.30	0.85
Protéine	g	1.67	4.71	Magnésium(Mg)	Mg	12	34
Graisse	g	1.17	3.30	Phosphore, (P)	Mg	36	102
Hydrates de carbone	g	18.70	52.73	Potassium, (K)	Mg	236	666
Fibre diététique	g	4	11.3	Sodium, (Na)	Mg	3	8
Sucre totale	g	13.67	38.55	Zinc, (Zn)	Mg	0.35	0.99
Vitamines				**Lipides**			
Vitamine C	mg	10.2	28.8	Acides gras saturé	G	0.120	0.338
Thiamine	mg	0.067	0.189	Acides gras mono-saturé	G	0.093	0.262
Riboflavine	mg	0.053	0.149	Acides gras poly-saturé	G	0.079	0.223
Niacine	mg	0.293	0.826	Acides gras	G	0	0
Vitamine B6	mg	0.075	0.211	Cholestérol	Mg	0	0
Folates	µg	38	107	**Autres**			
Vitamine E	mg	0.60	1.69	Caféine	Mg	0	0

Plusieurs études menées sur le Punica granatum révèle sa richesse en polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes ...) qui peuvent être rencontrés dans les différentes parties du grenadier. Ils sont donnés dans le tableau I.3 donné ci-après.

Tableau I.3 : Composition en polyphénols des différentes parties du grenadier [12].

Parties du grenadier	Constituants
Jus de fruit	Anthocyanines , glucose ,acide ascorbique, acide &llagique , acide gallique, acide caféique, catéchines, quercetine, rutine, des minéraux, acides aminés.
Huile de graine	95٪ acide punique, acide éllagique et autre acide gras, stérols.
Ecorce et zeste de fruit	Punicalagins phénoliques, acide gallique et autre acides gras, catéchine, quercetine, rutine et autre flavonoles, flavones, flavonones, anthocyanidines.
Feuilles	Tannins (punicalilavones, et punicafolin) et flavones, glycosides (lutéoléine et apigénine).
Fleurs	Acide gallique, Acide ursolique , triterpenoides
Racines et écorces	Ellagitannins (punicalin et punicalagins), nombreux alcaloïdes pipéridines.

L'écorce coriace de grenade et plutôt épaisse (2-3mm) est riche en tanins hydrosolubles, principalement en punicaline, pédunculaine et punicalagine. Il peut reformées jusqu'à 28% des tanins. L'écorce, riche en substances antimicrobiennes et antioxydantees, protège le fruit des prédateurs et des agressions du rayonnement solaire [21].

Une lecture rapide de ce tableau, montre la forte présence des composés phénoliques dans le fruit grenade. De ce fait, nous allons donner dans le paragraphe suivant quelques notions sur cette fameuse famille.

I.4. GENERALITES SUR LES POLYPHENOLS

I.4.1 Définition

Le terme« polyphénols» est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants dans

les végétaux. Donc la désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques [22].

I.4.2 Structure des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des plantes possédant une ou plusieurs groupements phénoliques, faisant partie de plus de 8000 structures différentes connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composes hautement polymérisés comme les tannins (figure I.4) [23].

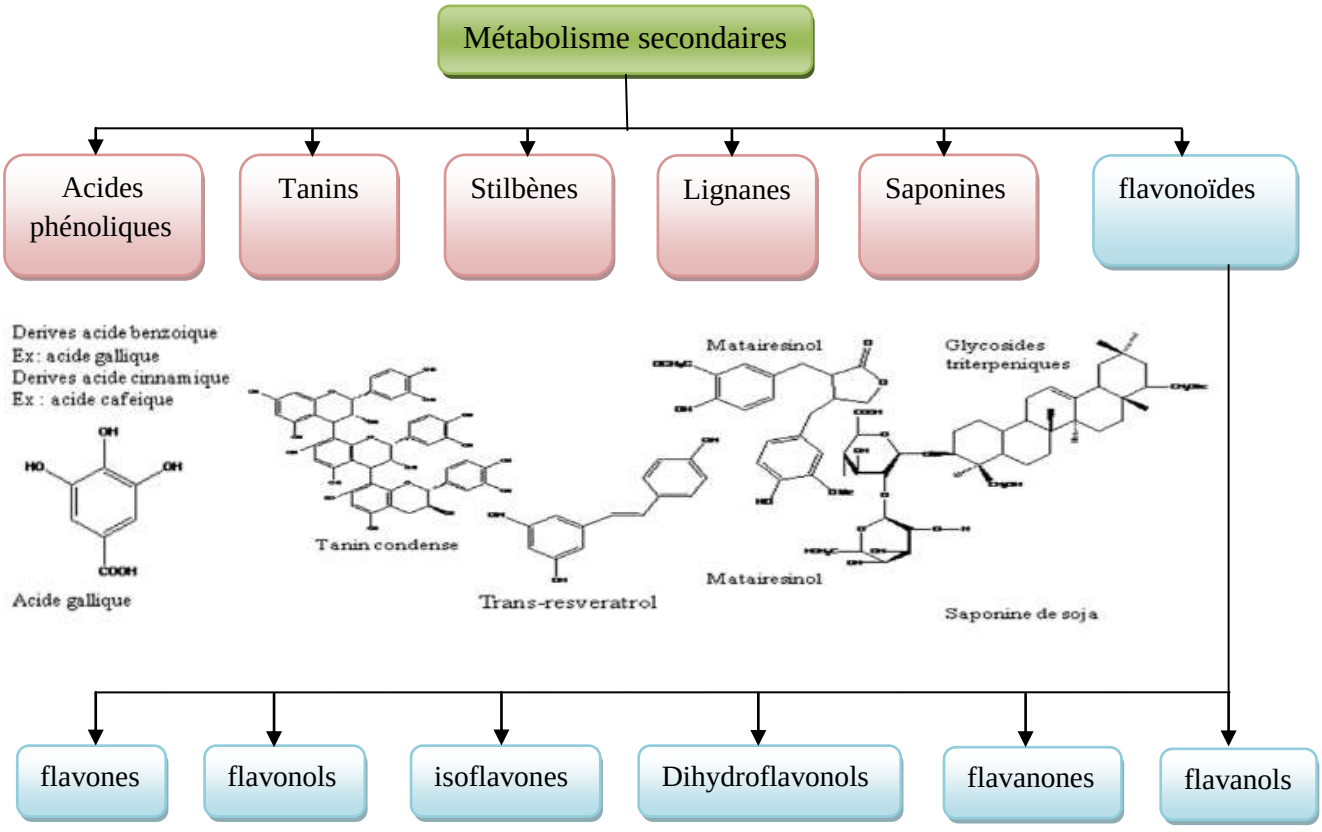


Figure I.4 : Classification de quelques métabolites secondaires [22]

I.4.3 Classification des polyphénols:

Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en flavonoïdes et non flavonoïdes.

I.4.3.1 Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles benzènenotés A et B reliés entre eux par une chaîne de carbones qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (Figure I.5). Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 ou 7 groupes comme le montre la (Figure I.4).Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est à-dire liée à des oses et autres substances [12 - 24].

Les Flavonoïdes sont impliqués dans d'importantes fonctions cellulaires, en affectant l'activité de nombreux systèmes enzymatiques in vitro mais également in vivo. Certaine possèdent des propriétés lypolitiques, protectrices de l'ADN [25]. Ces flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [26].

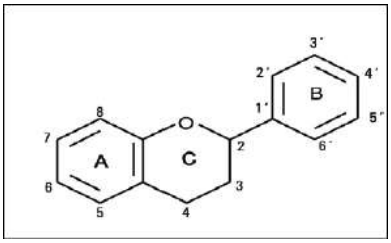


Figure I.5 : Structure de base des flavonoïdes [27].

Ces pigments végétaux ont de multiples effets sur l'organisme, un des plus importants étant de réduire la fragilité et la perméabilité des capillaires. Les flavonoïdes améliorent aussi l'action de la vitamine C sur l'organisme en augmentant son absorption et en retardant son élimination.

La rutine ($C_{27}H_{30}O_{16}$) fait partie de la grande famille des flavonoïdes, aussi appelés bioflavonoïdes.La rutine est chimiquement très proche de la quercétine (Figure I.6) et, comme

elle, possède des propriétés antioxydantees, anti-inflammatoires, Vasco protectrices (protection des vaisseaux sanguins) et antithrombotiques (protection contre la formation de caillots sanguins). Elle est présente dans plusieurs plantes médicinales [28].

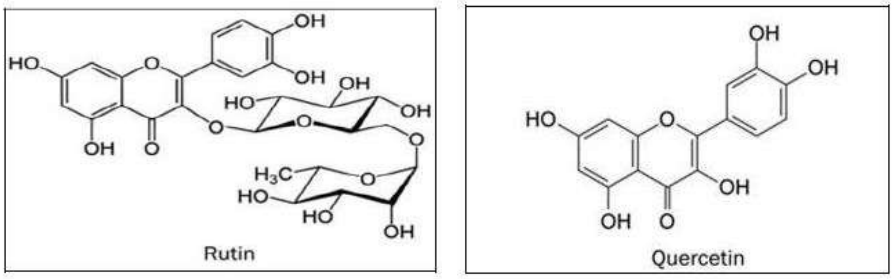


Figure I.6 : Les structures chimiques de la rutine et de la quercetine [28].

I.4.3.2 Acides phénoliques

Ces composés peuvent être classés en deux catégories:

A. Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque :

Comme exemple de cette famille, l'acide gallique et l'acide protocatéchique, dont la teneur dans les plantes comestibles est généralement très faible, sauf pour certains fruits rouges [29].

L'acide 3, 4, 5-trihydroxybenzoïque connu sous le nom d'acide gallique (Figure I.7), élément constitutif des tanins hydroxylables fréquemment utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Il est aussi un précurseur pour la synthèse d'un alcaloïde hallucinogène, la mescaline [12].

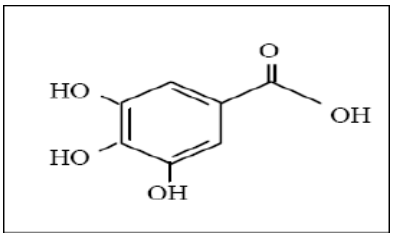


Figure I.7 : Structure de l'acide gallique [30]

B. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Ils correspondent principalement aux acides coumarique, caféique et férulique, qui sont rarement à l'état libre. Les formes liées sont des dérivés glycosylés ou des esters de l'acide quinique, shikimique ou tartrique [29].

L'acide caféique (Figure I.8), fréquemment présent dans les végétaux et dont l'une des formes, l'acide chlorogénique qui est une des molécules apportant des capacités thérapeutiques spécifiques à Vaccinium myrtillus [12].

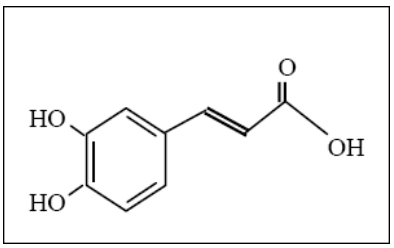


Figure I.8 : Acide hydroxycinnamique (acide caféique) [31].

I.4.3.3 Tanins

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire.

Ce sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. On distingue: les tanins hydrolysables et condensés. La structure chimique d'un tanin condensé est présentée sur la (Figure I.4) [32].

I.4.3.4 Stilbènes

Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, parmi ces composés on trouve le resveratrol qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales. Parmi ces composés, le trans-resveratrol est présenté dans le (Figure I.4) [33].

I.4.3.5 Lignanes

Les lignanes résultent de la dimérisation oxydative de deux unités de phénylpropane (Figure I.4), et sont essentiellement présentes dans la nature à l'état libre.Les graines de lin représentent une source alimentaire incontournable de ces composés [34].

L'intérêt pour les lignanes et leurs dérivés se développe en raison des leurs applications potentielles dans le traitement du cancer (chimiothérapie) [35].

I.4.3.6 Saponines

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon, vu que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Leur structure amphiphile (Figure I.4) combinant une partie polaire et une partie non polaire explique leur comportement moussant en solution aqueuse... On distingue les saponines stéroïques et les saponines triterpéniques dérivant tous deux de l'oxyde de squalène [36].

I.5. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DE LA GRENADE

En médecine traditionnelle, la grenade soigne les troubles d'érection, les toux persistantes (en gargarismes), les diarrhées, la colique et la fièvre. Elle est également employée comme vermifuge [37]. Le jus de grenade est utilisé dans les cures de nettoyage interne, destinées à faciliter la perte de poids. Elle contribue à réduire la pression sanguine systolique [38].

Très concentrée en polyphénols (Tableau I.3), la grenade pourrait avoir un effet positif sur les maladies cardio-vasculaires, l'arthrite et certains cancers, notamment le cancer de la prostate et celui du sein [39]. Selon les résultats de plusieurs études menées sur l'homme et l'animal, la grenade pourrait retarder le développement du cancer de la prostate et freiner notamment l'apparition des cancers urinaires et digestifs. Elle ralentirait la formation des plaques d'athérome, améliorerait l'état des diabétiques de type II (modérés) et apaiserait les rhumatismes inflammatoires [40].

Ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydante, anticarcinogénique, anti-inflammatoire et antidiabétique du grenadier [41].

I.5.1 Activité antioxydante

Des études *in-Vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier présentent 2 à 3 fois la capacité antioxydantee du thé vert en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux [42 - 43].

En effet, une seule grenade apporte près de 40% de nos besoins quotidiens en vitamine C [40]. Et consommée crue, la grenade apporte une quantité intéressante de vitamine B6, également reconnue pour ces propriétés anti oxydantes. Très riche en polyphénols (antioxydantes naturels), elle retarde le vieillissement des cellules, inhibe le développement de l'athérosclérose, influe sur l'hypertension et réduit le risque de maladies cardio-vasculaires [44].

Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydantes sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydantee du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit, Les punicalagins sont les ellagitannins majeurs dans le fruit entier et peuvent être hydrolysés en acide ellagique et d'autres plus petits polyphénols *in vivo* [45].

1.5.2 Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un ensemble de réactions générées par l'organisme en réponse à une agression subie. Les eicosanoïdes, substances qui sont formées à partir des acides gras sous l'effet de plusieurs enzymes, jouent un rôle important dans les processus inflammatoires, pré cancérigènes et cancérigènes. Et favorisent la croissance des cellules tumorales [46 - 1].

L'acide éllagique contenu dans un extrait de grenade, possède des pouvoirs anti-inflammatoires. Il permet de lutter contre l'inflammation tout en conservant les fonctions physiologiques des organes tels que le rein et l'estomac intactes. De ce fait, il n'y a aucun risque de provoquer ou d'aggraver un ulcère de l'estomac en utilisant des extraits de grenade comme anti-inflammatoire pour soulager l'arthrose et les rhumatismes, pour traiter les pathologies auto-immunes ou pour réduire les inflammations chroniques de l'intestin. Une étude *in-vivo* a démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase (principaux médiateurs de l'inflammation) [47 - 48].

I.5.3 Activité anticarcinogénique

Les cellules cancéreuses ont la capacité de redevenir des cellules saines par un processus appelé différenciation. Il a été observé que certains flavonoïdes peuvent induire cette différenciation, mais avec une toxicité plus faible que celle des molécules cytotoxiques classiques, ce qui rend ces molécules phytochimiques intéressantes dans la prise en charge de certains cancers, notamment celui de la prostate [49 - 50].

Il a été démontré que les polyphénols de la grenade inhibent la prolifération de nombreuses lignées tumorales comme celles des cellules hématopoïétiques, du sein, du côlon et bien sûr celles de la prostate [1].

I.5.4 Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéo-muqueux [51].

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 [52].

I.5.5 Autres effets de la grenade sur la santé

Parmi les vertus de la grenade, il a été aussi démontré son efficacité dans le traitement des maladies suivantes :

- **Problème de l'Estomac**: Les écorces de grenades et les feuilles sont utilisées pour calmer les troubles de l'estomac ou la diarrhée. Le jus de la grenade a aussi été utilisé pour alléger les problèmes de colique et choléra [53].

- **Trouble d'Alzheimer** : La consommation régulière selon un plan diététique d'un fruit de grenade en entier (toutes les parties) peut retarder la déficience mentale et comportementale dans la maladie d'Alzheimer [54].
- **Problème Cardiovasculaire** : la prise fréquente d'un jus de grenade fait maintenir une bonne circulation du sang dans le corps. Ceci, diminue le risque de crise cardiaque.

Aussi, il a été prouvé que l'extrait de grenade diminue la pression du sang d'un patient sous hémodialyse [55].

I.6. UTILISATION DU GRENADIER DANS L'INDUSTRIE

I.6.1 Industrie agroalimentaire

Le fruit grenade est largement utilisé dans le domaine agroalimentaire [12 - 56].

- Jus de grenade, confitures, vinaigres et liqueurs.
- Pour éviter le rancissement des corps gras.
- Produits nutraceutiques a base d'extrait d'écorce.
- Condiments et épices alimentaires.

I.6.2 Industrie cosmétique

Une étude a montré que l'extraits aqueux de grenade (surtout de l'écorce) encourage et renforce la régénération du derme. Cependant, l'huile des graines de la grenade améliore la régénération de l'épiderme [57].

L'extrait de grenade est déjà incorporé dans plusieurs lignes de produits cosmétiques qui exploitent son parfum, ses propriétés hydratantes et adoucissantes ainsi que ses effets raffermissants (crèmes anti-cellulite). Aussi l'application d'un extrait de grenade sur une peau humaine reconstituée apporte une protection très efficace contre les radiations UV [58].

I.6.3 Autres usages industriels

Dans l'histoire, l'extrait des feuilles du grenadier a été utilisé pour préparer de l'encre et les extraits du fruit grenade ont été utilisés pour préparer des teintures. En effet, une étude a montré que l'extrait de grenade peut être utilisé pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie, pour protéger les métaux de l'oxydation [56]. En outre, une récente étude reporte que la pelure de grenade a montré un pouvoir remarquable pour l'adsorption de quelques colorants [59].

Dans une autre étude les chercheurs suggèrent que des films 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 [57].

Chapitre II : Méthodes d’extractions

II.1 EXTRACTION SOLIDE LIQUIDE DES POLYPHENOLS

L'extraction des composés bioactifs à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt à cause de leur pouvoir antioxydante, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques [60].

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase solide qui contient la matière à extraire, et une phase liquide à savoir : le solvant d'extraction. Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant [61 - 62].

Parmi les méthodes d'extractions utilisées, on distingue : les méthodes traditionnelles et les méthodes innovantes dites « technique vertes ». Dans ce chapitre quelques méthodes appliquées pour l'extraction des composés phénoliques à partir de matière végétale diverses et plus particulièrement du fruit grenades sont présentées [63].

II. 2 METHODES D'EXTRACTION CONVENTIONNELLES

L'extraction à l'ancienne veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales. Les produits ainsi obtenus sont relativement impures sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe .Ils'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales [64].

II.2.1 Infusion

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper a fin d'extraire leurs principes médicinales .Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes: feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles [65].

II.2.2 Décoction

La décoction est adaptée plus pour l'extraction des constituants peu solubles et de structure non affectée par l'élévation de la température (ex : l'acide silicique) à partir de matières végétales durs sous très dures: bois, écorce, racines, ou même des plantes. Elle consiste à faire bouillir la matière solide fraîche ou séchée dans de l'eau pendant 10à 30 min, pour bien extraire les composés ciblés [66].

II.2.3 Macération

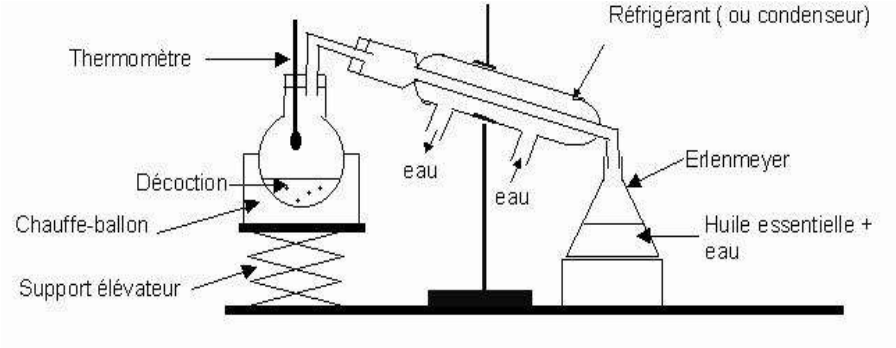
Elle consiste à mettre la plante en totalité ou seulement une partie, dans un solvant à température ambiante (macération à froid), pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Si le solvant est l'eau froide elle est dite macération aqueuse, et s'il est une huile végétale elle est dite macération huileuse.

Cette technique convient pour l'extraction de plantes contenant des constituants sensible à la température, comme : l'amidon ou la pectine. Elle est également utilisée pour éviter l'extraction des constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude [57].

La macération est un procédé généralement long et à rendement souvent moyen. Elle est la plus simple méthode utilisable dans le cas de l'extraction des molécules fragiles, et elle est très utilisée pour l'extraction des polyphénols à partir des écorces de grenade. Pour être efficace, une macération, peut durer de 4 à 10 jours environ; ceci peut présenter quelquesinconvénients, tels que la fermentation, ou la contamination bactérienne notammentsi le solvant utilisé est l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation rapidedes molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macérationpeut être opérée dans un récipient couvert à l'abri de la lumière ou bien même dans un réfrigérateur à une température modérée [67].

II.2.4 Hydro-distillation et entrainement à la vapeur

C'est une technique très ancienne utilisant la vapeur d'eau pour récupérer les composés volatiles notamment les huiles essentiels (Figure II.1).Développée par Jabir Ibn Hayan qui a rajouté l'alambic à l'ancien appareil de distillation [57].De nos jours cette technique traditionnelle est encore utilisée pour l'extraction de certaines plantes aromatiques (Figure II.2) [68].



FigureII.1 : Schéma de l'hydro-distillation[57].



Figure II.2 : Distillation traditionnelle des fleurs de roses [57].

L'entrainement à la vapeur ressemblant à l'hydro-distillation consiste à ne pas placer les plantes dans l'eau. En fait, on fait bouillir de l'eau dans un ballon pour générer de la vapeur d'eau qu'on fait passer à travers les plantes dont on veut récupérer l'huile. L'avantage de cette technique réside en l'abaissement de la température de distillation ; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses, ce qui évite leur décomposition [69].

II.2.5 Extraction par Soxhlet

Comparée aux techniques précédentes, c'est une méthode simple et techniquement plus moderne. Elle permet de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière végétale, d'où vient son efficacité élevée en terme de rendement. Cependant, le Soxhlet présente entre autres, les inconvénientssuivants : le temps d'extraction relativement long, la possibilité de dégradation des composés à cause d'une surchauffe locale, le choix limité du solvant, et les difficultés d'utilisation de mélanges de solvants [69].

Dans le montage (Figure II.3), l'extracteur Soxhletest placé au-dessus d'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 [69].

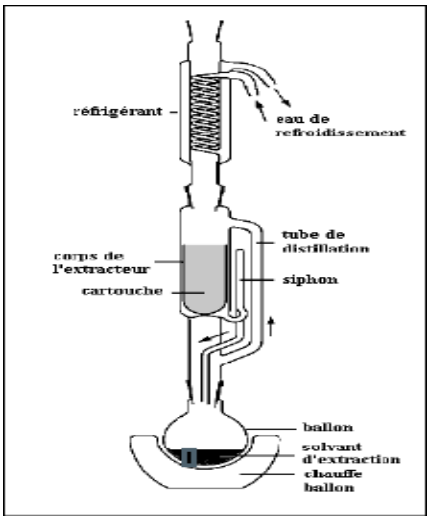


Figure II.3 Schéma de l'extracteur Soxhlet [69].

II.3 METHODES D'EXTRACTION INNOVANTES

Parmi les techniques non conventionnelles et écologiques, qui respectent les principes de base de la chimie verte (utilisation de solvant non toxiques et réduction des dépenses énergétiques), les plus utilisée pour l'extraction des polyphénols sont: l'extraction par fluides supercritiques, par eau surchauffée ou subcritique, l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction assistée par ultrasons [70].

II.3.1 Extraction par fluide supercritique

L'extraction avec des fluides supercritiques est une méthode très attractive qui mérite une attention particulière [71].Il s'agit d'un procédé d'extraction très récent opérant à froid en utilisant un fluide sous des conditions particulières bien définies. Par exemple le gaz carbonique (CO_2) sous pression élevée et à température supérieure à 31°C, il se trouve dans un état dit« supercritique », intermédiaire entre le gaz et le liquide. Dans cet état, le CO_2 présente la particularité de dissoudre de nombreux composés organiques. Cette propriété a été mise à profit pour extraire plusieurs matières premières végétales dont la grenade a fait partie [72].Les avantages de cette méthode devant les techniques conventionnelles sont : une meilleure sélectivité des molécules à extraire, la facilité d'éliminer le solvant après l'extraction par simple décompression, et la durée d'extraction qui est généralement plus courte [69].

II.3.2 Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons est une technologie émergente utilisée pour l'extraction des composés bioactifs à partir de substances naturelles.Les ultrasons interagissent avec le solide végétal et modifient ses propriétés physiques et chimiques. Ceci est due au fait que, les ondes sonores génèrent des vibrations mécaniques dans le solide et peuvent se propager pour créer un phénomène appelé « cavitation acoustique ». Ce qui facilite la libération des composés extractibles à travers les parois cellulaires des plantes [73].

Le choix approprié du solvant et de la température a permet une meilleure extraction des composés phénoliques. De plus, l'optimisation des paramètres tels que la fréquence et la puissance des ultrasons, ainsi que la distribution d'ondes ultrason a permet aussi d'augmenter le rendement d'extraction en un temps plus court [74 – 75 - 76].

II.3.3 Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est unchauffage sélectif utilisant les radiations micro-ondes qui interagissent avec les dipôles des molécules polaires ou polarisables présentes dans la matière végétale. Les molécules polaires ou polarisables tentent de s'orienter (en rotation) dans la direction du champ électrique et comme cela elles chauffent. Ainsi, l'énergie électrique est convertie en énergie cinétique qui est ensuite transformée partiellement en chaleur. Cette chaleur fait accélérer la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales [77].

L'extraction par micro-ondes est largement exploitée en vue d'intensifier le rendement en composés bioactifs extraits. Cependant, l'effet thermique de ces ondes qui est presque localisé à l'échelle moléculaire et limité à une petite région en profondeur proche de la surface du matériau, fait que les grosse particules ou agglomérats des petites particules ne peuvent pas être chauffées uniformément ; c'est l'inconvénient majeur du chauffage par micro-ondes. Les deux paramètres affectant ce type d'extraction sont la puissance de lamicro-onde et la durée de l'extraction[78].

II.4 PRINCIPAUX PARAMETRES INFLUENCENT DE L'EXTRACTION SOLIDES - LIQUIDE

Les paramètres physiques qui influencent le déroulement et déterminent l'efficacité d'un procédé d'extraction sont nombreux, mais les plus étudiés dans le cas des composés phénoliques sont : la température, rapport solide/liquide, temps de contact, nature et composition du solvant, vitesse et durée d'agitation, diamètre et forme du solide soumit à l'extraction et le pH du milieu [79].

II.4.1 Température

Dans la plupart des cas, les valeurs élevées de température ont un effet positif sur le rendement d'extraction et ceci par ce que la chaleur :

- Facilite l'extractionen augmentant les coefficients de diffusion à travers les parois Cellulairesqui seront pluspermeables.
- Augmente fréquemment la solubilisation des matières àextraire.
- Diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite le passage du solvant àtravers la masse solide, et aussi son séparation du composé à extraire.

La limite supérieure de la température d'extractiondes permise est imposée par le point d'ébullition du solvant, en prenant en compte le risque de dégradation thermique du composé phénoliques ainsi que la possibilité d'extraire des composés nuisibles[67].

II.4.2 Rapport solide/ solvant

Le rapport solide/solvant a « logiquement » un effet positif sur le rendement d'extraction. Cependant, il faut savoir que même si les rendements sont plus grands dans les cas de rapports solvant-solide élevés, l'utilisation de grandes quantités de solvant n'est pas souhaitable car cela nécessiterai plus d'énergie pour l'éliminer ou le séparer afin d'obtenir l'extrait sec. Ce paramètre est étroitement lié au dimensionnement de l'unité d'extraction, qui peut être très grande dans le domaine de l'agroalimentaire, ou bien moyenne à petite dans le domaine pharmaceutique. Ainsi, une optimisation de ce paramètre est donc souvent nécessaire [80].

II.4.3 Temps d'extraction

Le temps de contact entre le solvant et la matière solide est un des paramètres très importants à optimiser. Car ce paramètre reflète la cinétique selon laquelle se déroule l'extraction. En terme de productivité (temps minimal et rendement optimal) ; la comparaison entre les différentes méthodes d'extraction citées précédemment a montré que les techniques nouvelles peuvent donner le même rendement optimal en un temps très court [29].

II.4.4 Nature du solvant

La naturephysique et chimique (polaire, apolaire, composition, propriétés) du solvant est très importante pour pouvoir extraire, d'une manière sélective les molécules souhaitées. En effet, le solvant doit avoir une affinité importante pour les molécules ciblées et posséder une grande capacité de dissolution. De plus, une faible viscosité du solvant facilitera sa pénétration dans la matrice solide. Une température d'ébullition moyenne permettra de réduire l'énergie nécessaire pour la séparation des molécules extraites de celles du solvant. Généralement, pour l'extraction d'antioxydantes dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques, des solvants « Food grade » sont utilisés [81 - 82].

En général, le choix d'un solvant pour l'extraction de composés bioactifs est basé sur les critères suivants [63]:

- Solubilité des composés bioactifs dans le solvant,
- Régénération du solvant pour être recyclé,
- Pouvoir mouillant remarquable du solvant (il doit amplement mouiller le solide)
- Non toxique, non réactif, non inflammable, peu ou non polluant et peu coûteux.

II.4.5 Agitation mécanique

L'agitation des particules solides dans le solvant permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu. Ceci va certainement réduire la résistance au transfert des molécules bioactives au niveau de l'interface solide-liquideen augmentant la surface de contact. Aussi, si une agitation intense est maintenue durant une longue durée, la probabilité des chocs entre les différentes particulessolides va s'accentuer, ce qui permettra par la suite l'éclatement et la fissuration de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans la phase liquide[83].

II.4.6 Taille des particules

L'échange de matière dans un système solide-fluide est nettement amélioré par l'augmentation de la surface de contact, qui est inversement proportionnelle à la taille des particules. Ainsi, dans la majorité des travaux publiés et des procédés réalisés sur l'extraction solide-liquide, le solide est préalablement découpé ou broyé pour diminuer sa taille[84].

Bien que, la diffusion interne est plus rapide dans le cas de particules fines. Les particules de taille très fine peuvent créer un problème technologique délicat ; à savoir, le tassement du lit des particules solides. Ce phénomène peut provoquer la diminution de la perméabilité du lit au solvant et la formation de lignes de courants préférentiels dans le système solide-fluide qui sera donc qualifié par « non uniforme » [85].

II.4.7 pH du milieu

La polarité de beaucoup de composés varie avec le pH du solvant. Par conséquent, leur solubilité dépend aussi de l'acidité/basicité du solvant. Effectivement, l'extraction de matières végétales à différents pH a permisd'obtenir des extraits riches en composés de fonctionnalités distinctes. Par exemple, une extraction à pH 6 a permis d'obtenir de meilleurs rendements en composés phénoliques, tandis que le pH 10 a été optimal pour extraire les acides gras et les protéines à partir des fibres d'avoine [86].

II.5 RESUME DE QUELQUES TRAVAUX EFFECTUES SUR L'EXTRACTION DU GRENADIER

L'étude des effets de ces paramètres sur la quantité et la qualité des composés phénoliques obtenus par extraction a fait l'objet de nombreuses recherches anciennes et récentes. Dans le tableau II.1 on récapitule succinctement l'essentiel de quelques travaux de recherches réalisés sur l'extraction des composés phénoliques de la grenade en utilisantdes techniques différentes. Dans cette étude la méthode d'extraction choisie est celle par solvant à chaud.

Tableau II.1 : Résumé de quelques travaux effectués sur l'extraction du grenadier.

Méthode	Référence	Partie degrenade	Payé d'origine	Solvant	s/l (g /ml)	T(°C)	t (min)	d_p(µm)	TPC (mgAG/100gMP)	R(%)
ESC	[79]	Ecorce	Chine	Méthanol	1 /15	40	240	400	8.26	46,5
EU	[74]	Ecorce	Iran	Méthanol	1/50	70	30	250	9365.70	46.9
	[87]	Ecorce	Chine	Ethanol	1/24	55	63	140	13.658 %	13.78
	[92]	Ecorce	Grèce	Huilevégétale	0.10	51,5	30	100	-	84
EFS(10-30MPa)	[88]	Feuilles	Barazile	Ethanol	-	40-50		24-48	257-389	21-67
EMO	[90]	Pulpe	Italie	Eau	1/40	-	10	-	59(mgAG/100ml)	23 .6
	[93]	Ecorce	China	Ethanol (50%)	1/20	-	2	400-600	TF=0.187	2.946
ES	[91]	Grain	Iran	benzène et hexane)	1/31	35	360	400	780–7210	-

EFS: Extraction par fluide supercritique

ES : Extraction par Soxhlet

ESC: Extraction par solvant à chaud

EU: Extraction par ultrason

MO : Extraction par micro-ondes

mPa: Unité de pressions milli Pascal

R: Rendement de l'extraction

S/L: Rapport solide /liquide

TF : Teneur en flavonoïdes

TPC: Totale polyphénols contentent T: Température

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1 MATERIELS ET PRODUITS

Toutes les expériences et analyses effectuées au cours de cette étude ont été réalisées au niveau du Hall Technologique et dans le laboratoire de recherche « laboratoire matériaux et environnement » (LME) au sein de l'Université de Médéa.

L'étude de l'activité microbienne a été réalisée dans un laboratoire de biologie au niveau de la Direction de la santé et de la population de Médéa. Le matériel et les produits utilisés dans toute cette étude sont regroupés dans le tableau ci-après (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Matériel et produits utilisés

Matériels et appareils	Produits
-Plaque chauffante et barreau magnétique -Papier filtre standard type Fisher Brand. - Centrifugeuse type Hettid zentrifugene ba20 -Etuve en 500 (nüve) -Evaporateur rotatif -Microscope optique Micros AUSTRIA (Anti-Mould) -Spectrophotomètre Uv-vis cintra 303 shimadzu GBC V4074 -Micro-ondes Whirlpool easytranic 750 watt -Autoclave OSK 6500 - Bec benzène - Disques vierges de 9 mm	-Ethanol Sigma-Aldrich (pureté ≥96%) -Eau distillée -Eau physiologie -Acide gallique Sigma (97.5-102.5%) -Bicarbonate de sodium Na_2CO_3 (75 g/l) -Folin-Ciocalteu (diluée 10 fois) -Rutine hydraté Sigma (pureté ≥94%)) -Chlorure d'aluminium $ALCL_3$ -Milieu de culture Mueller- Hinton

III.2 PROTOCOLE EXPERIMENTALE

III.2.1 Préparation du matériel végétal

Les fruits de grenade ont été récoltés au mois de novembre au niveau de la région de Médéa. Les Grenades ont été lavées par l'eau du robinet ensuite par l'eau distillée pour ensuite les épluchées et récupérer l'écorce du fruit, qui représente « la matière première végétale». Les écorces obtenues ont été séchées à l'air libre, ensuite conservées dans des sacs en plastiques dans des endroits sec jusqu'à utilisation. Les écorces de grenade conservées sont ensuite étuvées à 40 °C pendant 7 jours jusqu'à ce que leur poids soit constant (Figure III.1).



Figure III.1: Préparation de la matière végétale.

III.2.2 Préparation de la poudre de grenade

Les écorces de grenade ont été soumises aux deux opérations suivantes :

a) Broyage

Les écores sèches, ont été broyées par un mortier ensuite par un moulin à poivre afin d'obtenir une poudre fine (figure III.2).

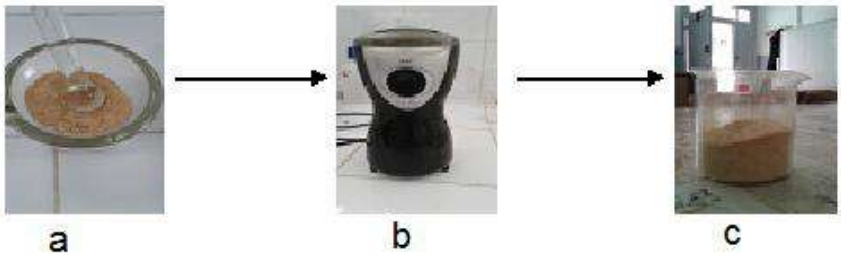


Figure III.2 : a) Mortier ; b) Moulin à poivre ; c) Poudre de grenade

b) Tamisage

La méthode de tamisage selon la norme AFNOR X 31-107 AFNOR, 1994 consiste à classer les différents poudres d'un échantillon solide en utilisant une série de tamis ou

passoire (Figure III.3), 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 restant dans chaque tamis **(refus)** est pesée puis convertis en % [94].



Figure III.3 : Série de tamis et tamiseuse

III.2 CARACTERISATION DU MATERIEL VEGETAL

III.2.1 Détermination de la teneur en eau

Une masse m_0 des écorces de grenade conservées sont étuvées à 40°C pendant 7 jours jusqu'à ce que leur poids soit constant m_1 (Figure III.1). La teneur en eau « humidité » des écorces de grenade utilisées a été déterminée par la formule suivante [67]:

- $\text{Teneure en eau} = \frac{(m_0 - m_1)}{m_1} \times 100$ **(III.1)**
- $\text{Taux d'eau} = \frac{(m_0 - m_1)}{m_0} \times 100$ **(III.2)**

III.2.2 Détermination du diamètre moyen de la poudre de grenade

Le diamètre moyen de la poudre de l'écorce de grenade été déterminé selon la méthode AFNOR X31-107 (AFNOR, 1994). Cette poudre a été fractionnée en trois lots de diamètre différent.

III.2.3 Caractéristiques organoleptiques

Les caractères organoleptiques de la poudre des écorces de grenade qui ont été observées sont : L'aspect, l'odeur, et la couleur de la poudre.

Parlant de l'aspect solide de la poudre, la structure des particules a été exploitée par microscope optique Micros AUSTRIA (Anti-Mould) utilisant logiciel INFINITY Lite.

III.3 PROCEDURE D'EXTRACTION

III.3.1 Extraction par solvant à chaud (ESC)

L'extraction par solvant à chaud a été effectuée comme suit (Figure III.4) :

On pèse une quantité de masse m_p de la poudre de grenade de diamètre d_p dans un erlenmeyer, on ajoute un volume du solvant noté v_s, selon un rapport (solide /liquide) noté (s/l). Le mélange est agité continuellement sur une plaque chauffante à une température T sous une vitesse (350 tr /min) et pendant une durée t.



Figure III.4 : Extraction par solvant à chaud

Les conditions opératoires choisis pour l'extraction par solvant à chaud sont résumées dans le tableau III.2. Ces conditions ont été sélectionnées en se basant sur les travaux antérieurs réalisés sur l'extraction des composés phénoliques à partir de la grenade (Tableau II.1).

Tableau III.2 : Conditions opératoires de l'extraction par solvant à chaud :

Solvant	Rapport (s/l) (g/ml)	Diamètre de poudre d_p (mm)	Temps t (h)	Température T (°C)
Eau	1/15 ; 1/25 ; 1/35	0.08 ; 0.1 ; 0.16	1 ; 2 ; 3	40 ; 50 ; 60
Ethanol	1/15 ; 1/25 ; 1/35	0.08 ; 0.1 ; 0.16	1 ; 2 ; 3	40 ; 50 ; 60
Ethanol 50%	1/15 ; 1/25 ; 1/35	0.08 ; 0.16	1 ; 2 ; 3	40 ; 50 ; 60

III.3.2 Extraction par micro-onde (MO)

L'extraction par micro- onde notée (MO) a été effectuée par un micro-onde de type Whirlpool (Figure III.5), L'extraction a été réalisée comme suit:

On pèse une masse m_p bien définie de la poudre de grenade de diamètre d_p dans un erlenmeyer, on ajoute un volume du solvant v_s selon un rapport (solide/liquide) bien défini noté (s/l), le mélange est met dans le micro- onde pendant t = 2 min sous une puissance de 400 Watt [93].



Figure III.5 : Micro-onde.

Les conditions opératoires choisies pour l'extraction par micro-onde sont résumées dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Conditions opératoires de l'extraction par micro-onde.

Solvant	Rapport (s/l) (g/ml)	Diamètre de poudre (mm)
Eau	1 /15 ; 1/25 ; 1/35	0.08
Ethanol	1 /15	0.08
éthanol 50%	1 /15	0.08

III.4 RECUPERATION DE L'EXTRAIT LIQUIDE

Après l'étape d'extraction, l'extrait liquide obtenu a été soumis aux deux opérations suivantes (Figure III.6) :

III.4.1 Filtration

L'extrait liquide a été filtré à l'aide d'un papier filtre standard de type Fisher brand. Et on récupère le filtrat.

III.4.2 Centrifugation

Le filtrat liquide a été centrifugé par une centrifugeuse (Tableau III.1) à une vitesse de 4000 tr/min pendant 15min. Le surnageant liquide est conservé à T=4°C dans un réfrigérateur jusqu'à utilisation [41 - 22].



Figure III.6 : Etapes de récupération de l'extrait.

III.4.3 Rota-évaporation des extraits éthanoïques

Au cours de notre travail expérimental, nous avons rencontré des problèmes pour l'analyse des échantillons issus de l'extraction par l'éthanol. Pour cette raison, tous les échantillons de l'éthanol sont passés par le rota-vapeur (Figure III.7) pour éliminer le solvant organique (éthanol) et pour obtenir les mêmes conditions avec les autres solvants à la cour du dosage.

Les extraits obtenus par l'eau et par éthanol 50% ont été utilisés tel qu'ils sont dans les différentes méthodes d'analyse. Par ailleurs les extrais éthanoïques sont évaporés sous vide à une température de 80°C. La masse (m_{ext}) du solide qui reste dans le ballon est récupérer par un volume (v_s) d'eau, la valeur de (m_{ext}) est mesurée afin de pouvoir déterminer ultérieurement le rendement.



Figure III.7 : le rota-vapeur (évaporateur rotatif).

III.5 RENDEMENT D'EXTRACTION PAR ESC

Le rendement d'extraction par ESC a été déterminée pour les extraits liquides issus de l'extraction par éthanol est calculé par la formule donnée: [95].

$$R\,(\%) = 100 \times \frac{m_{ext}}{m_p} \qquad \textbf{(III.3)}$$

Où :

R : rendement d'extraction (%).

m_{ext} : masse de l'extrait après évaporation du solvant (mg).

m_p : masse de la poudre de l'échantillon végétal (mg).

III.6 CARACTERISATION DE L'EXTRAIT DE GRENADE

III.6.1 Caractère organoleptique

Les caractères organoleptiques : l'aspect physique, l'odeur, et la couleur des extraits de grenade obtenus par les deux méthodes d'extraction sont détectés.

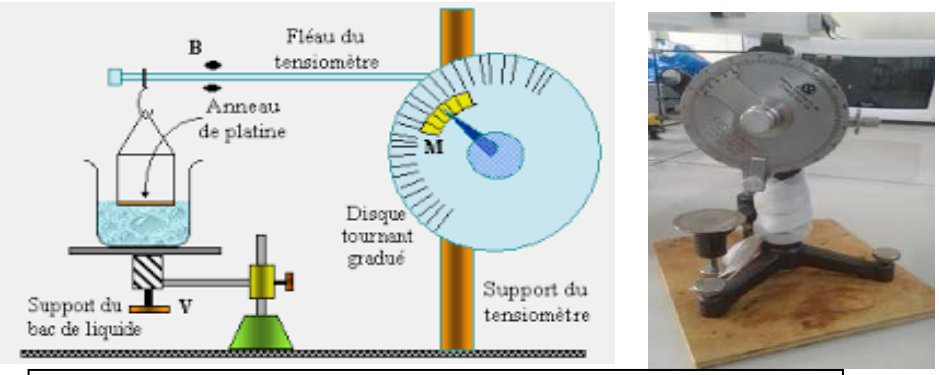
III.6.2 Test de présence d'agent tension active

III.6.2.1 Test de moussage

La présence d'agents tensioactifs dans les extraits obtenus par la méthode ESC a été détectée par la méthode de moussage. Un volume de l'extrait pris dans un tube à essai a était vigoureusement agité avec vortex puis laissé au repos 10 minutes. Ensuite la hauteur de la mousse a été mesurée par une règle.

III.6.2.2 Mesure de la tension superficielle

La tension Superficielle est une grandeur physique qui rend compte de la force qu'exercent les molécules qui se trouvent à la surface séparant deux milieux. En présence d'autres molécules étrangères (tensioactifs) à la surface cette force diminue. Donc, la mesure de la tension permet de déterminer la concentration d'un soluté par unité d'aire [96].



B : butés du fléau. V : vis sans fin permettant le déplacement vertical de l'échantillon
M : système de vernier pour la lecture de la tension.

Figure III.8 : Schémas du tensiomètre de LECOMPTE DU NOUY [96].

L'appareil est constitué d'un disque gradué qui permet une lecture directe de la tension. L'appareil est muni d'une sorte de vernier qui permet une lecture fine de la tension. Permet de visionner ce que l'on observera lorsque le fléau du tensiomètre tire l'anneau vers le haut : le liquide demeure en quel que sorte coller à l'anneau (Figure III.9). La valeur de la tension superficielle entre l'extrait et l'air est lue au point de séparation de l'anneau de la surface du liquide.

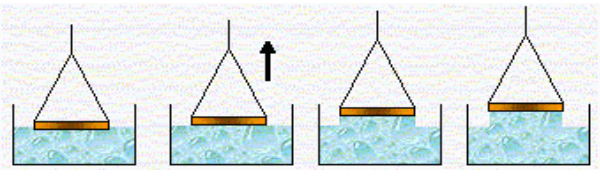


Figure III.9 : Effet de la montée de l'anneau sur la surface du liquide [96].

III.7 DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES

Les extraits de grenade obtenus ont été caractérisés chimiquement en déterminant la composition de ces extraits en composés phénoliques ayant une grande importance et présentant des applications multiples déjà démontrées. Nous avons suivi la teneur des polyphénols totaux et celle des flavonoïdes. Le dosage des composés phénoliques a été effectué par la spectrophotométrie UV-Visible.

III.7.1 Principe spectrométrie UV – Visible

La spectrophotométrie UV-Visible repose sur l'interaction du rayonnement Électromagnétique avec de la matière dans le domaine proche de l'UV au très proche IR soit entre 180 et 1100 nm. Cette partie du spectre est relativement pauvre en informations sur la structure des composés moléculaires. En revanche, l'absorbance des composés dans le proche UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert (Figure III.12). Cette loi qui exprime la relation proportionnelle entre la concentration et l'absorbance.



Figure III.10 : Spectrophotomètre UV-vis.

III.7.2. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

Le dosage des polyphénols totaux (Tp) par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines diverses.

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) [97].

Le dosage des acides phénoliques totaux dans un échantillon (l'extrait de grenade et le blanc) se fait par Spectrophotomètre UV-vis selon le protocole suivant [98]:

- ✓ 1 ml de réactif de Folin- Ciocalteu (dilué 10 fois).
- ✓ 0.2 ml de l'extrait de grenade (k= 200 fois).
- ✓ Agiter par le vortex pendant 20 s, et laisser 5 min à l'abri de la lumière.
- ✓ Ajoute 0.8 ml de bicarbonate de sodium Na_2CO_3 (75g/l).
- ✓ Agiter par vortex 20 s, et incuber pendant 5 min à 40°C à l'abri de la lumière.
- ✓ Lire l'absorbance à 760 nm.
- ✓ Le blanc utilisé a la même composition en remplaçant 0.2 ml de l'extrait par 0.2ml d'eau distillée.

La coloration produite (changement de couleur du vert vers le bleu), dont l'absorption maximale a été lue à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

- **Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

L'acide gallique a été choisi comme un étalon pour les composés phénoliques. La courbe d'étalonnage de ce dernier a été réalisée selon le protocole cité précédemment, où l'absorbance des solutions filles a été notée pour des concentrations bien définies à 760 nm [97].

- **Préparation de solution mère :** On met 0.005g de l'acide gallique dans une fiole de 250 ml. La solution est bien agitée jusqu'à la solubilisation complète du solide, pour obtenir une concentration de 20µg/ml.
- **Préparation des solutions filles :** pour obtenir les concentrations (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 µg/ml) on prélève un volume bien défini de la solution mère dans une fiole de 25ml puis on complète par de l'eau distille jusqu'au trait de jauge.
- **Remarque :** Pour les extraits d'éthanol 50% l'étalon est solubilisé dans le mélange 50% (eau + éthanol).

- **Calcul de la teneur en polyphénols totaux**

La concentration des composés phénoliques (C) est déterminée en introduisant l'absorbance de l'échantillon dans l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (étalon) établie à une longueur d'onde de 760 nm.

La teneur en polyphénols totaux dans un gramme de matière sèche (poudre de grenade) est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique (mg EAG/g) est calculée selon la formule suivante

$$Tp = \frac{v_s \times C \times k}{m_p} \quad \textbf{(III.4)}$$

Avec :

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

v_s : 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 de la poudre de grenade (g).

III.7.3 Dosage des flavonoïdes totaux

- **Principe**

Les flavonoïdes contenus dans les extraits de grenade sont estimés par la méthode de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) [99]. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, qui présente un maximum d'absorption dans le spectre UV-Vis à 430nm.

- **Courbe d'étalonnage de rutine**

La rutine a été choisie comme un étalon pour les flavonoïdes. La courbe d'étalonnage de ce dernier a été réalisée selon le protocole cité précédemment, où l'absorbance des solutions filles a été notée pour des concentrations bien définies à 430 nm [100].

- **Préparation de solution mère :** On a pèse 0.02g de la rutine dans une fiole de 100 ml puis laisse agite pour obtenus une concentration de 200µg/ml.
- **Préparation des solutions fille :** prélève différent volume de la solution mère déjà préparé dans des fioles de 10ml puis rempli par l'eau distille jusqu'à le tri de jauge
- **Remarque :** Pour les extraits d'éthanol 50% l'étalon est solubilisé dans le mélange 50% (eau + éthanol).

- **Détermination de la teneur en flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes dans un échantillon (l'extrait de grenade ou le blanc) se fait par Spectrophotomètre UV-vis selon le protocole suivant :

- ✓ 2 ml de l'extrait dilué (k=200 fois).
- ✓ 2 ml de solution éthanoïque d'$AlCl_3$ (2% massique) dilué dans 100 ml d'éthanol.
- ✓ Agiter par le vortex pendant 20 s, et incuber pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière.
- ✓ Lire l'absorbance a 430 nm.
- ✓ Le blanc utilisé a la même composition en remplaçant 2 ml de l'extrait par 2ml d'eau distillée.

La concentration des flavonoïdes (C) est déterminée en introduisant l'absorbance de l'échantillon dans l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de la rutine (étalon) établie à une longueur d'onde de 430 nm.

La teneur en flavonoïdes dans un gramme de matière sèche (poudre de grenade) est exprimée en milligramme équivalent de rutine (mg ERU/g) est calculée selon la formule suivante

$$TF = \frac{V_s \times C \times k}{m_p} \qquad \textbf{(III.5)}$$

Avec :

TF : Teneur de l'extrait en flavonoïdes (mg ERU/g).

V_S : Volume d'échantillon (ml).

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

k : Facteur de dilution.

m_P : Masse de la poudre de grenade.

III.8 ACTIVITE ANTIOXYDANTE

A. Principe

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH) est réalisé par la méthode décrite par Ammar et al., (2009).qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la CI_{50} des

substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le $DPPH^{\bullet}$ est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H^{+}, qui est dans notre cas le composé phénolique (AH) qui contient un cycle aromatique lié à un groupe hydroxyle (OH) [101].

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \qquad \textbf{(III.6)}$$

Où AH est un composé capable de céder un H^{+} au radical $DPPH^{\bullet}$ et le DPPH-H est un composé non réactif.

B. Mode opératoire

Mettre 1.5 ml de chaque extrait ayant une gamme de concentration (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg EAG/ml) dans un tube à essai, ajouter 0.8 ml de solution éthanolique de DPPH (2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle). Le mélange est incubé 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Un control est utilisé contenant 0.8 ml de solution éthanolique de DPPH avec 1.5 ml d'eau distillée. Lire l'absorbance à 517 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol pur. L'activité anti-oxydante des extraits en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) selon la relation suivante.

$$\%\ \text{Inhibition} = \frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs Extrait})}{\text{Abs Control}} \times 100 \qquad \textbf{(III.7)}$$

A partir de la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en polyphénols totaux, la valeur de la CI_{50} peut être déduite. La valeur CI_{50} représente la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical $DPPH^{\bullet}$.

III.9 ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Dans le cadre de tester l'efficacité thérapeutique des molécules contenues dans les écorces de grenade, L'activité microbiologique de l'extrait de grenade a été investiguée. Les Microorganismes testés sont trois, à savoir : *Escherichia -coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et *Candida albicans*.

Cette étude pratique est réalisée sur milieu solide et non en milieu liquide, car la plus économique est Celle sur milieu solide. Cette méthode permet de tester plusieurs souches bactériennes en même temps (il est possible d'ensemencer une trentaine de souches dans une

seule boîte de pétri par la méthode de touches [102]. Parmi les méthodes qui existent en microbiologie, la méthode de diffusion (antibiogramme) étant la plus utilisée a été choisie dans notre étude. Cette technique repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide.

L'effet du produit antimicrobien (ici c'est 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 [103].

L'étude de l'activité microbiologique des extraits obtenus, débute par la détermination de la concentration minimale d'inhibition CMI.

A. Définition de la CMI

La CMI signifie la concentration minimale d'inhibition des microorganismes. Il s'agit de déterminer la plus petite concentration de l'extrait de l'écorce de grenade qui pourrait stopper la croissance des micro-organismes ou empêcher leur développement [104].

B. Micro-organismes testés

Le choix des bactéries a été porté sur trois souches fréquentes. Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries et une levure (tableau III.3) :

Tableau III.3 : Microorganismes étudiés

	Souche	Source	Gram	Nature
Souches Bactérienne	*Staphylococcus aureus*	ATCC 12228	Positif (+)	Pathogène
	Escherichia –coli	ATCC 1536	Négatif (-)	Pathogène
Souche Fongique	*Candida albicans*	ATCC 10231	Levure	Pathogène

C. Protocol expérimental

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton. La détermination de la CMI a été effectuée selon les étapes suivantes :

Dilution : On met 2 ml de l'extrait de grenade dans un tube à essai puis on réalise une dilution de 50%, ensuite on répète l'opération jusqu'à la 5ème dilution. La figure (III.11) représente les différentes étapes de la dilution de l'extrait de grenade. Ainsi, on prépare six solutions de concentration différentes.

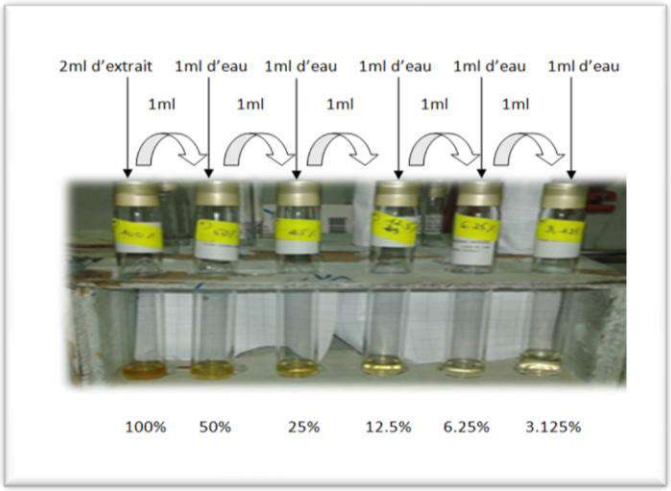


Figure III.11 : Différentes étapes de dilution.

Ensemencement par écouvillonnage : On a Stérilisé l'écouvillon avec la flamme de bec benzène puis on a pris une quantité de la souche bactérienne, on l'a rincée dans le tube contenant de l'eau physiologique on a bien homogénéisé la solution, ensuite on a fait l'ensemencement par écouvillonnage dans les 6 boites, pour chaque souche préalablement coulées par gélose nutritive (stérilisation de l'écouvillon et du flacon avant chaque ensemencement).

Application des disques : à l'aide d'une pince stérile, Les disques imprégnés d'extraits de grenade sont déposés délicatement sur la surface des boites pétri inoculée par la gélose, on place pour chaque boite pétri trois disques provenant de tubes de dilutions différentes. On refait l'opération pour les six dilutions.

Incubation : On fait l'incubation des boites pétris dans l'étuve à 37°C pendant 24heurs pour les bactéries et 48 h pour les levures.

Lecture : Elle consiste à mesure les diamètres des zones d'inhibition autour des disques à L'aide d'une règle graduée.

Le pouvoir antimicrobien a été exprimé en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, il est classé en 04 classes :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur a 28mm.
2. Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 16 et 28 mm.
3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 10 et 16 mm.
4. Non inhibitrice lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 10 mm.

Chapitre IV : Résultats et discussions

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

- Caractérisation de la poudre des écorces de grenade ;
- Caractérisation des extraits de grenade ;
- Etude paramétrique de l'extraction ;
- Analyse quantitative des extraits en composé phénoliques ;
- Etude de l'activité antioxydante des extraits de grenade ;
- Etude de l'activité antimicrobienne des extraits de grenade.

IV.1 TENEUR EN EAU DANS LES ECORCES DE GRENADE

La teneur en eau des écorces de grenade utilisées dans cette étude est donnée dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV.1 : Résultats de mesure de l'humidité des écorces de grenade.

Taux d'humidité (g/100 g de base humide)	19.356
Teneure d'humidité (g / 100 g de matière sèche)	24.002

Selon les valeurs obtenues, nous constatons que les écorces de grenade sont moyennement humides. Donc on peut dire que l'étape de séchage ou chauffage prolongé qui a été adoptée dans cette étude nous a énormément aidés pour faciliter le broyage et aussi améliorer la conservation de la poudre des écorces de grenade jusqu'à son utilisation.

IV.2. CARACTERISATION DE LA POUDRE DES ECORCES DE GRENADE

IV.2.1 Caractère organoleptique

Les caractéristiques organoleptiques de la poudre de grenade obtenue après broyage sont résumées dans le tableau IV.2 présenté ci-dessous :

Tableau IV.2 : Caractéristiques organoleptiques de la poudre de grenade.

	Aspect physique	Odeur	Couleur
	Poudre fine	Faible	Jaune foncée

La poudre de grenade obtenue après broyage était conservée dans des boites en plastiques à l'abri de la lumière.

IV.2.2 Diamètre moyen de la poudre de grenade

Les résultats de l'essai de tamisage effectué sur la poudre de grenade issue d'une étape de broyage sont donnés sur la figure IV.1.

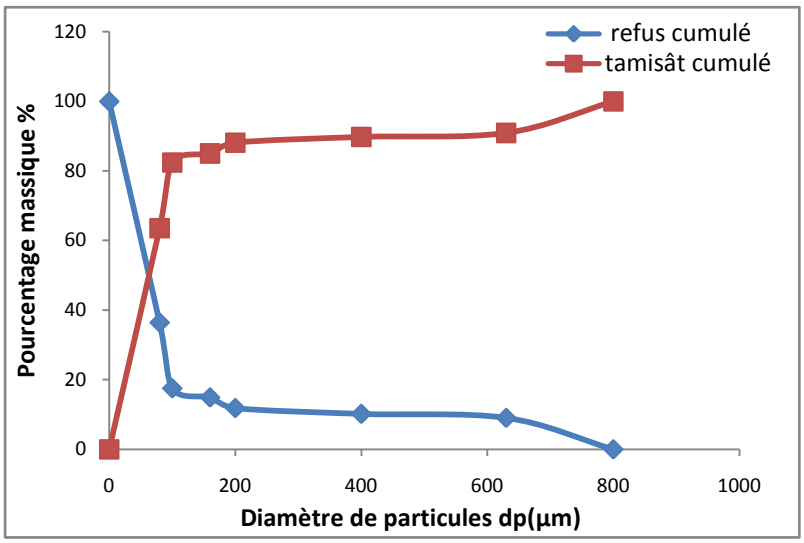
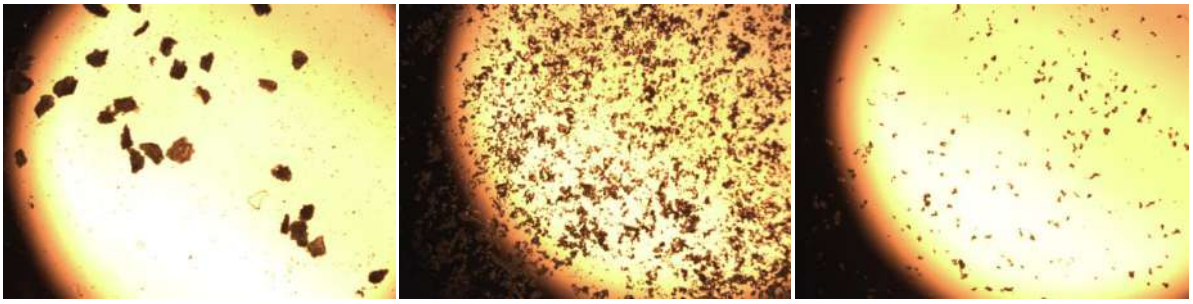


Figure IV.1 : Diamètre moyen de la poudre de grenade

D'après figure IV.1, le diamètre moyen (d_p) de la poudre d'écorce de grenade après un seul broyage est 80µm (0.08mm). Cette poudre a été fractionnée en trois lots dont les diamètres des particules d_p sont : 0.08 mm, 0.1 mm et 0.16 mm.

La microscopie optique de ces trois lots de poudre de grenade a donné la figure IV.2, présentée ci-dessous. Ce figure montre bien l'uniformité et la finesse de la granulométrie des particules solides. Les particules étant uniformes cela sera en faveur d'une extraction plus efficace.



dp= 0.16 mm dp= 0.1 mm dp= 0.08 mm

Figure IV.2 : Images des particules de poudre, 4x0.1

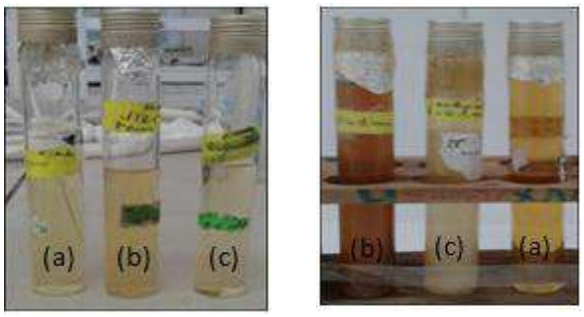
IV.3 CARACTERISTIQUES DES EXTRAITS DE GRENADE

L'extraction des écorces de grenade a été effectuée sous les différentes conditions présentées dans les tableaux III.3 et III.4 donnés dans le chapitre précédent. L'extraction des composés phénoliques à partir des écorces de grenade a été effectuée par deux méthodes différentes :

- Extraction par solvant à chaud ; notée (ESC).
- Extraction par solvant assistée par micro-onde ; notée (MO).

IV.3.1 Caractère organoleptique

Les extraits des écorces de grenade obtenus par extraction par ESC et par MO sont présentés dans la figure IV.3.



(A) **(B)**

Figure IV.3 : Extraits de grenade par : (A) Micro-onde; (B) Solvant à chaud.

(a) Extrait d'Ethanol 50% ; **(b)** Extrait d'eau; **(c)** Extrait d'éthanol.

Les caractéristiques organoleptiques des extraits obtenus par les trois solvants (eau, éthanol et Ethanol 50%) et par les deux méthodes d'extraction sont résumées dans les tableaux IV.3 et IV.4.

Tableau IV.3 : Caractéristiques organoleptiques des extraits de grenade par ESC.

Extrait	**Aspect**	**Odeur**	**Couleur**
Eau	Liquide homogène	moyenne, caractéristique de l'écorce de grenade	Marron
Ethanol	Liquide homogène	moyenne, caractéristique de l'écorce de grenade	Jaune clair
Ethanol 50%	Liquide homogène	moyenne, caractéristique de l'écorce de grenade et de l'éthanol	Jaune foncé au Miel

Tableau IV.4 : Caractéristiques organoleptiques des extraits de grenade par micro-onde.

Extrait	**Aspect**	**Odeur**	**Couleur**
Eau	Liquide homogène	Forte, caractéristique de l'écorce de grenade	Jaune
Ethanol	Liquide homogène	Forte, caractéristique de l'écorce de grenade	Jaune clair
Ethanol 50%	Liquide homogène	Forte, caractéristique de l'écorce de grenade	Jaune clair

IV.3.2 Présence des substances tensioactives dans l'extrait de grenade

Après l'agitation des différents extraits obtenus par extraction par solvant à chaud, nous avons constaté la formation de la mousse dans les extraits des trois solvants (Figure IV.4).

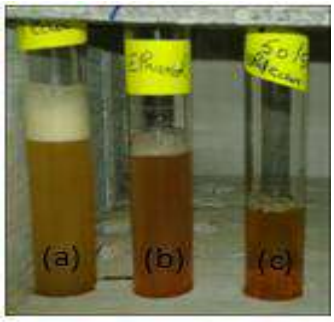


Figure IV.4 : Test de moussage.

(a) Extrait d'eau **; (b)** Extrait d'éthanol**; (c)** Extrait Ethanol 50%.

Afin de comparer le pouvoir de moussage dans ces extraits, la hauteur de la mousse a été mesurée après 10 minutes de repos. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5 : Hauteurs de la mousse dans les extraits (t= 3h, T=40°C, rapport (s/l)=1/15, d_p= 0.08mm).

Solvant	Eau	Ethanol	Ethanol 50%
Hauteur de la mousse (cm)	1.5	0.4	0.2

La formation de la mousse dans les extraits de grenade démontre la présence de saponine dans les écorces de grenade. Parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Les saponines sont des molécules naturellement produites par des plantes ou des animaux [22]. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse [36].

Tous les aliments riches en saponine sont recommandés pour se prémunir du cancer. Les saponines ne jouent pas seulement le rôle de détergents mai aussi, elles se lient aux molécules toxiques ou au cholestérol pour former des pores dans les bicouches des membranes cellulaires et éliminent le tout par les voies naturelles. En outre les saponines ont aussi été utilisées comme adjuvants de vaccins, et dans certains compléments alimentaires.

Concernant la hauteur de la mousse (Tableau IV.5), la différence observée entre les trois extraits peut être due à la fois à la teneur de chaque extrait en saponine, et aussi à la nature du solvant qui facilite l'encapsulation de l'air pour former la mousse [105]. Jusqu'à l'heure actuelle, la présence de composés ayant une activité surfacique dans le fruit grenade n'a pas fait l'objet de travaux de recherches.

IV.3.3 Teste de la tension superficielle

Les valeurs de la tension superficielle obtenues à température ambiante pour trois extraits par ESC dont les conditions sont : Eau, 40°C, d_p= 0.08 mm et t = 3h sont présentées dans le tableau IV.6.

Tableau IV.6 : Tension superficielle des extraits de grenade (40°C, d_p= 0.08 mm t = 3h).

Rapport (s/l)	1/15	1/25	1/35
Tension superficielle (dyn/cm)	49.5	49	49

Selon ce tableau la tension superficielle est constante pour les trois extraits testés, dans lesquels 1g de poudre de grenade a été extraite par un volume d'eau qui varie de 15ml vers 35ml. Ceci montre que la quantité de poudre utilisée dans les trois extraits est supérieure à la concentration de micellisation connue par «concentration micellaire critique », à partir de laquelle la tension superficielle de l'eau reste presque constante.

D'autres part, la valeur 49 dyn/cm est très petite comparée à la tension superficielle de l'eau qui est environ 72.2 dyn/cm à température ambiante. Ceci reflète la présence de molécules ayants un pouvoir tensioactif remarquable, qui leurs donne la possibilité de diminuer la tension superficielle d'une manière très significative.

IV.4 ETUDE PARAMETRIQUE DE L'EXTRACTION

Dans cette partie, nous présentons les résultats de l'étude paramétrique (effet des paramètres) obtenus pour les différentes extractions ESC en utilisant l'éthanol comme solvant.

IV.4.1 Effet du diamètre des particules

L'effet du diamètre des particules (d_p) de grenade sur le rendement globale de l'extraction a été examiné pour les extraits éthanoïques dont les conditions sont : rapport solide/ liquide (s/l) égale à 1/15, température T = 40 °C et durée d'extraction t= 3h. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau IV.7.

Tableau IV.7 : Rendements d'extraction à différent diamètre des particules (s/l=1/15, T=40°C, t= 3h).

d_p (mm)	0.08	0.1	0.16
Rendement (%)	29.95	16.10	20.15

La comparaison entre les trois extraits d'éthanol montre que le rendement le plus élevé est obtenu pour le diamètre 0.08mm. Ceci fait appel à la proportionnalité inverse qui existe entre la surface de contact et diamètre des particules l'efficacité du solvant dans un processus d'extraction. Les ayants une surface de contact plus grande quand leur diamètre est petit.

Le même résultat a été trouvé par Reza et al., [74], qui ont trouvé avec l'extraction à ultrason un rendement entre 30 et 40% pour un diamètre qui varie entre 0.18 et 0.85 mm [74]. Aussi, récemment en 2016, Huang et al., ont trouvé pour une extraction de 3minute par microonde un rendement maximal en polyphénols égale à 42.60% pour les conditions : Ethanol 60%, s/l = 1/40, T = 60 °C, d_p entre 400 et 600µm [93].

IV.4.2 Effet de la température

L'effet de la température sur le rendement de l'extraction est examiné sous les conditions suivant : rapport solide/ liquide (s/l) égale à 1/15, d_p = 0.08mm et une durée de 3h. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.8.

Tableau IV.8 : Rendements d'extraction à différent température.

Température (°C)	40	50	60
Rendement (%)	29.95	37.92	40.25

Les résultats obtenus confirment l'effet positif qu'a la température sur l'extraction. En effet le rendement augmente proportionnellement avec la valeur de la température, et le maximum est obtenu pour T = 60 °C. En inspectant les résultats de Boggia et al., [90], pour une extraction à chaud de 10 minute par l'eau donne un rendement en polyphénols totaux égale à 36 mgEAG/100ml pour les conditions : s/l = 3/40, T = 50 °C [90]**.** Notons ici, que dans notre cas le rendement maximal est obtenue pour un temps t= 3h et un rapport s/l = 1/ 15 et T= 60°C.

IV.4.3 Effet du rapport (s/l) et du temps d'extraction

Pour connaitre l'effet du rapport (s/l) sur le rendement de l'extraction, les conditions choisis sont : d_p = 0.08 mm, T=40°C et le temps est 3h. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau IV.9.

Tableau IV.9: Rendements d'extraction pour différent rapport (s/l).

Rapport s/l (g/ml)	1/15	1/25	1/35
Rendement (%)	29.95	20.50	13.37

Par ailleurs, Dans le cas de l'effet du temps, les rendements obtenus pour l'extraction sous les conditions : rapport s/l égal à 1/15, d_p=0.08 mm et T = 40°C sont donnés dans le tableau IV.10.

Tableau IV.10 : Rendements d'extraction pour différent temps.

Temps (h)	1	2	3
Rendement (%)	28.94	21.67	29.95

L'investigation de l'effet de ces deux paramètres sur l'extraction des polyphénols est largement étudiée. Selon Zhenbin et al. [79], l'augmentation du rendement en fonction du rapport s/l et le temps d'extraction est toujours limitée par une étape d'équilibre dans laquelle ces deux paramètres n'ont aucun effet positif sur l'extraction. En effet, l'augmentation de la masse du solide par rapport au volume du solvant peut causer la saturation rapide de la solution. Les résultats observés dans les deux tableaux IV.9 et IV.10, montrent bien quelques contradictions avec ceux de la bibliographie, ce qui impose une étude de reproductibilité des résultats dans le future. Dans notre cas, le rendement maximal est obtenue pour un temps t=3h et un rapport s/l = 1/ 15.

IV.5 DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX

IV.5.1 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Pour déterminer la teneur des différents extraits en polyphénols, un balayage du spectre UV-Vis a été effectué de la longueur d'onde 500 nm jusqu'à 800 nm pour obtenir l'absorbance maximal (densité optique maximale) qui correspond à la longueur d'onde maximale qui caractérise le composé à détecter. L'absorbance maximale de l'acide gallique a été obtenue à 760 nm.

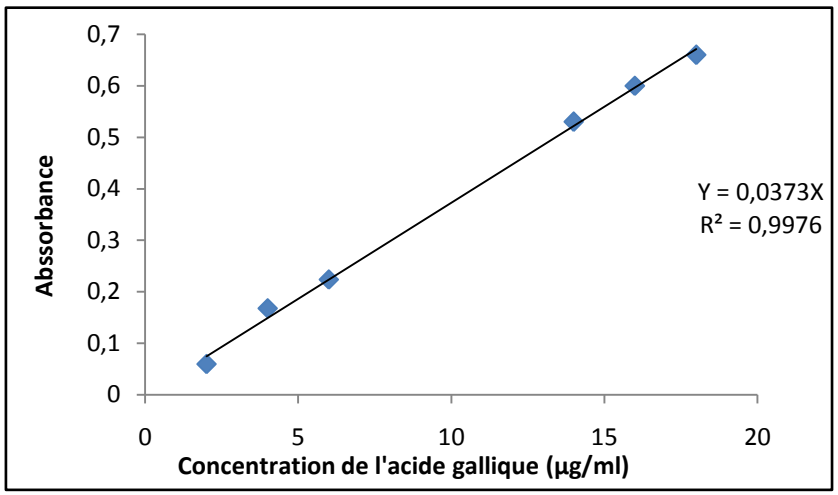


Figure IV.5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique à 760 nm

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques a été réalisée en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, en remplaçant l'acide gallique par des dilutions des extraits jusqu'à une concentration appropriée.

La quantité des phénols totaux dans les extraits est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par 1g de matière végétale (mg EAG/ g). Les résultats obtenus sont présentés dans les figures suivantes.

IV.5.2 Effet du rapport solide/liquide

L'effet du rapport solide/liquide sur l'efficacité d'extraction des polyphénols totaux par ESC sous les conditions : T = 40°C, t=3h, d_p=0.08mm et par les trois solvants : l'eau, l'éthanol et Ethanol 50% est illustré sur la figure IV.6.

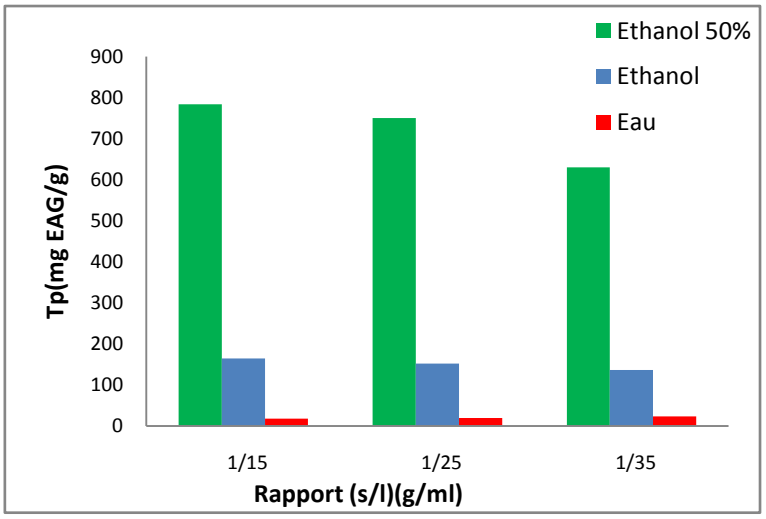


Figure IV.6 : Effet du rapport solide/liquide sur l'extraction des polyphénols totaux

Selon cette figure, les teneurs en polyphénols totaux pour les deux solvants éthanol 50% et éthanol diminuent faiblement en fonction du rapport s/l. Par contre pour les trois valeurs du rapport s/l la teneur en polyphénols dans les extraits d'eau est presque la même. Ces résultats peuvent nous informer sur la présence d'une valeur optimale du rapport s/l proche ou égale à 1/15.

La comparaison de nos résultats (un maximum de 783.89 mg d'EAG/g de polyphénols totaux) avec ceux d'autres recherches, montre que la quantité des polyphénols totaux dans le fruit que nous avons utilisés est élevée. Où, Rawahi et al.,ont obtenus 64,2(mg d'EAG/g) de grenade cultivé à Oman [106]**.** Et Mutahar et al.,[87] ont obtenu 274,1 et 91,2 (mg d'EAG/g) de polyphénols totaux dans les extraits de méthanol et d'eau respectivement de la variété Yéménite de grenade. Par ailleurs, nous constatons que les extraits les plus riches en polyphénols totaux sont ceux obtenus par un mélange 50% éthanol+50% eau.

IV.5.3 Effet de la température

Effet de la température sur l'extraction des polyphénols totaux par ESC et sous les conditions : rapport(s/l) =1/15, T = 40°C, t=3h, d_p=0.08mm et par les trois solvants : l'eau, l'éthanol et Ethanol 50% est illustré sur les figures IV.7.

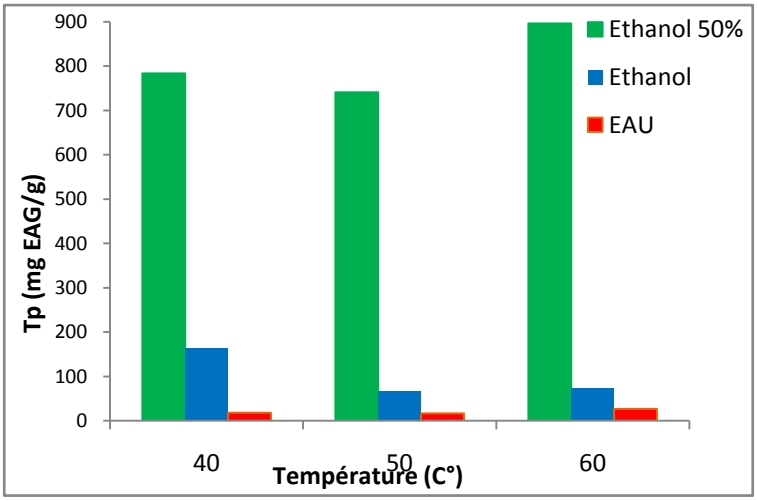


Figure IV.7 : Effet de la température sur l'extraction des polyphénols totaux

Selon les résultats obtenus (figure IV.7) on constate que l'effet de la température dans l'intervalle choisi (40°C-50°C) n'est pas très significatif pour les trois solvants. Où, les teneurs en polyphénols diminuent légèrement pour les extraits d'éthanol et ils sont presque constants pour les extraits d'eau. Cependant, pour les extraits d'éthanol 50% l'augmentation de la température de 40 à 60 °C améliore légèrement le rendement en polyphénols.

Selon le travail de Zhenbin et al., [79]. La teneur en polyphénols totaux dans les extraits de grenade par le méthanol sous une température de 40 °C est 826 mg EAG/100g de matière. Et d'après [45], une macération à froid de 135mg d'écorce de grenade peut donner 122.33 et 176 mg/g de polyphénols totaux par éthanol et eau respectivement.

IV.5.4 Effet du diamètre des particules de grenade

Effet du diamètre des particules sur l'extraction par solvant à chaud des polyphénols totaux par l'eau, l'éthanol et Ethanol 50% avec un rapport(s/l) =1/15, T = 40°C, t=3h est illustré sur les figures IV.8.

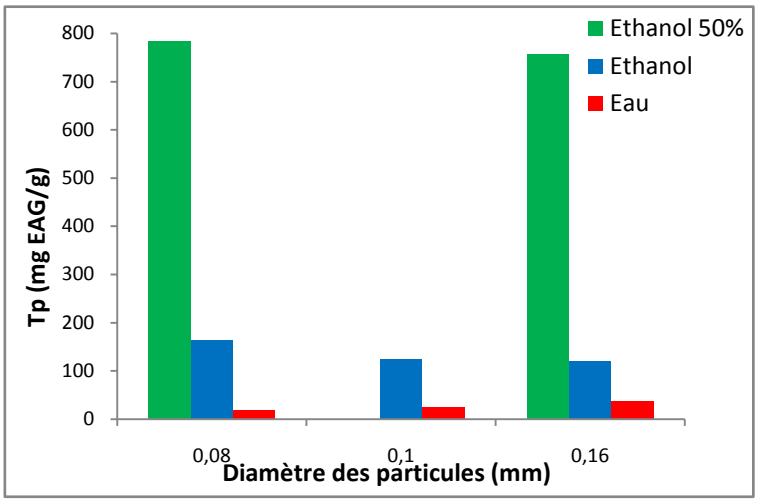


Figure IV.8 : Effet du diamètre des particules sur l'extraction des polyphénols totaux

L'examen de cette figure montre que la quantité en compose phénoliques sont presque les mêmes pour les trois diamètres de particules étudies, on constate que l'effet de diamètre des particules dans l'intervalle choisi (0.08-0.16 mm) n'est pas très significatif, et que peut être le diamètre optimal est atteint dans cette intervalle. En effet, l'étude menée par Mutahar et al.,[87] a montré une teneur en polyphénols totaux exprimée en pourcentage de 13.658 % par extraction assistée par ultrason en utilisant l'éthanol avec un diamètre de particules d'écorces de grenade égale à 140µm.

IV.5.5 Effet du temps d'extraction

L'effet du temps sur l'extraction des polyphénols totaux par les trois solvants sous les conditions : T = 40°C, s/l =1/15, d_p=0.08mm est présenté sur la figure IV.9.

D'après les résultats obtenus illustrés sur cette figure, la teneur en polyphénols totaux augmente en fonction du temps pour les trois solvants. Cependant, pour les extraits d'éthanol 50% la teneur en polyphénols est différemment dépendante du temps d'extraction, ce qui est illustré par la valeur obtenue à t=2h qui est inférieure à celles obtenues après 1heur et 3heurs d'extraction. La quantité maximale obtenue est celle d'éthanol 50% après un temps t= 3h.

Selon le travail de Zhenbi et al., [79]. La teneur en polyphénols des extraits de grenade pour méthanol après un temps de 4heurs est 8.26 mg EAG/ g.

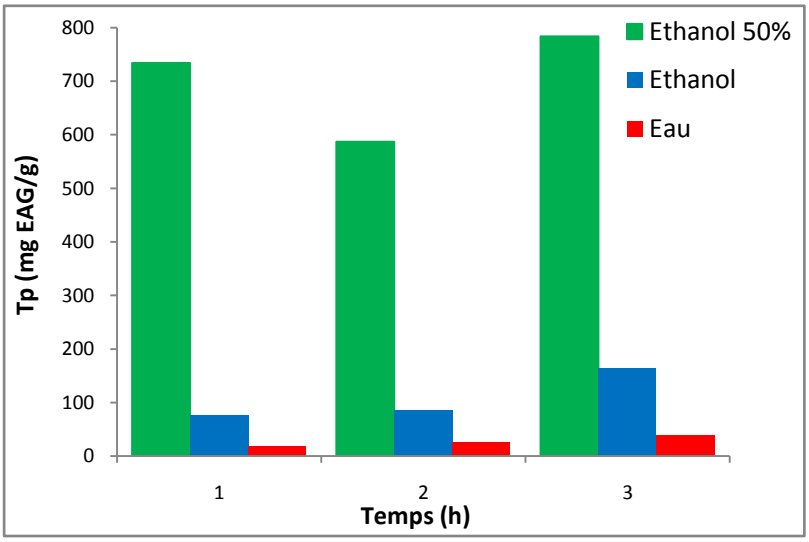


Figure IV.9 : Effet du temps sur l'extraction des polyphénols totaux

IV.6 DOSAGE DES FLAVONOÏDES

IV.6.1 Courbe d'étalonnage de la rutine

Des dosages spectrophotométriques ont été effectués à partir des extraits d'eau, éthanol 50% et éthanol afin de déterminer la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage (figure IV.10) a été réalisée avec la rutine à une longueur d'onde 430 nm.

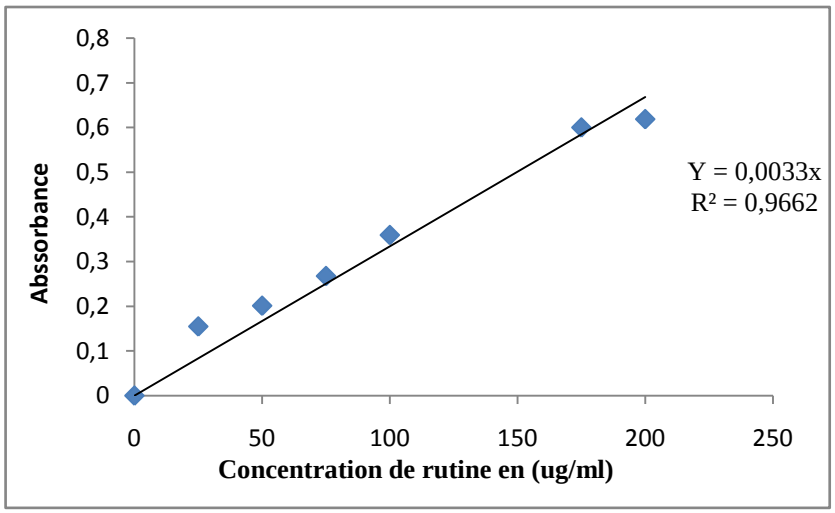


Figure IV.10 : Courbe d'étalonnage de la rutine à 430 nm.

L'analyse quantitative des flavonoïdes dans les extraits phénoliques a été réalisée en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, en remplaçant la rutine par des dilutions des extraits jusqu'à une concentration appropriée. La quantité des flavonoïdes dans les extraits est exprimée en milligramme équivalent rutine par 1g de matière végétale (mg ERU/ g). Les résultats obtenus sont représentés en histogrammes dans les figures suivantes.

IV.6.2 Effet du rapport solide/liquide

L'effet du rapport (solide/liquide) sur l'extraction des flavonoïdes sous les conditions T=40°C, t=3h, d_p= 0.08mm est présenté dans la figure IV.11.

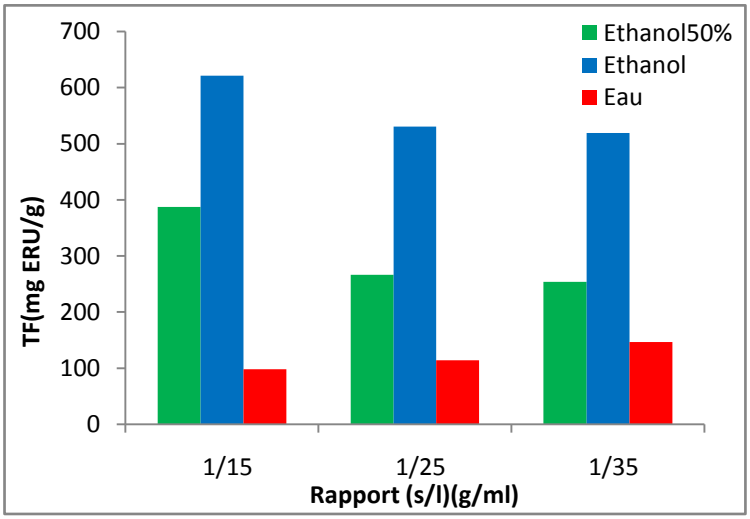


Figure IV.11 : Effet du rapport solide/liquide sur l'extraction des flavonoïdes

La figure ci-dessus présente une diminution légère de la teneur en flavonoïdes en fonction du rapport s/l pour les deux solvants : éthanol et éthanol 50%, ce qui observé précédemment pour les polyphénols totaux. Cependant, les extraits d'eau évoluent contrairement. De plus, nous remarquons que l'éthanol est le solvant qui donne le meilleur rendement en flavonoïdes, suivi par l'éthanol 50% ensuite l'eau. Selon ce résultat, nous proposons la valeur de s/l =1/15 comme une valeur optimale pour extraire le maximum de flavonoïdes.

IV.6.3 Effet de la température

Cette effet est illustré sur la figure IV.12 pour les conditions: t=3h, s/l =1/15, d_p=0.08mm.

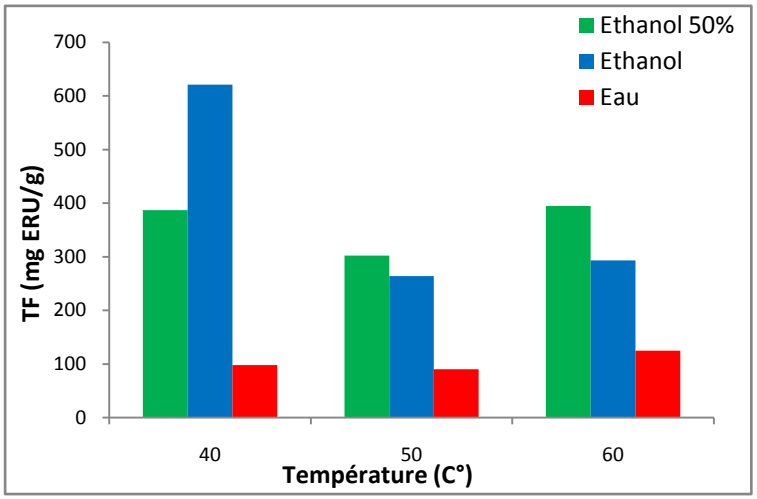


Figure IV.12 : Effet de la température sur l'extraction des flavonoïdes

Selon cette figure, la teneur en flavonoïdes dans les extraits d'eau augmente avec l'accroissement de la température. Le même comportement est observé pour les deux autres solvants (éthanol 50% et éthanol), ce qui se traduit par l'importance du chauffage pour l'extraction de ces composés. Toutefois, nous constatons un résultat inexplicable pour ces deux solvants pour une température de 40°C (valeur plus élevées que celles à 50 et 60°C).

Généralement, la température a un effet positif sur l'extraction des composés phénoliques à partir de sources végétales. Les teneurs en flavonoïdes [45] par une macération à froid de 135mg d'écorce de grenade peut donner 135 et 81.33 mg/g de flavonoïdes par éthanol et eau respectivement.

IV.6.4 Effet du diamètre des particules de grenade

l'effet du diamètre des particules sur l'extraction des flavonoïdes par l'eau, l'éthanol et Ethanol 50%, sous les conditions T=40°C, t=3h, rapport (s/l) =1/15 est présenté sur la figure IV.13.

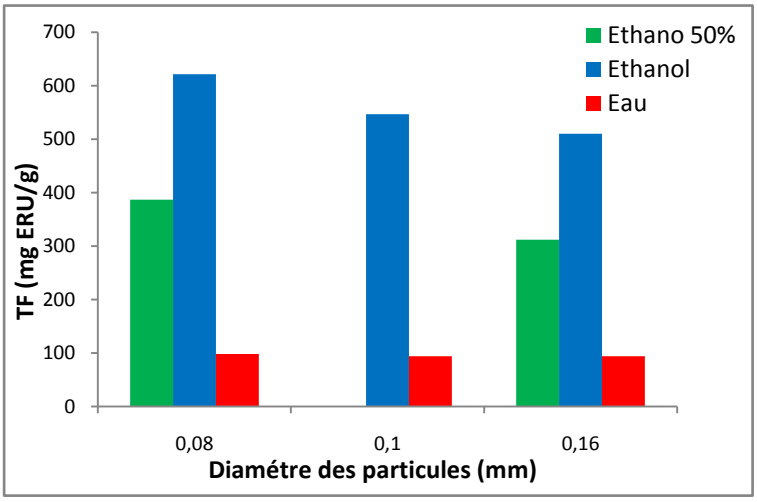


Figure IV.13 : Effet du diamètre des particules sur l'extraction des flavonoïdes

Dans cette figure nous remarquant une diminution des teneurs en flavonoïdes pour les trois solvants en augmentant le diamètre des particules. Le diamètre optimal d_p=0.08mm, Cette évolution est logique puisque la surface de contact augmente avec la taille des particules.

Selon le travail D'Alessandro et al.,[29] l'extraction assistée par ultrasons des flavonoïdes à partir d'Aronia melanocarpa confirme également que l'extraction à partir de baies broyées est beaucoup plus efficace que l'extraction à partir de baies coupées en deux montrant l'importance du broyage de la matière première avant l'extraction.

IV.6.5 Effet du temps d'extraction

L'effet du temps sur l'extraction des flavonoïdes par les trois solvants : l'eau, l'éthanol et Ethanol 50% et sous les conditions : rapport(s/l) =1/15, T = 40°C, t=3h, d_p=0.08mm est illustré sur les figures IV.14.

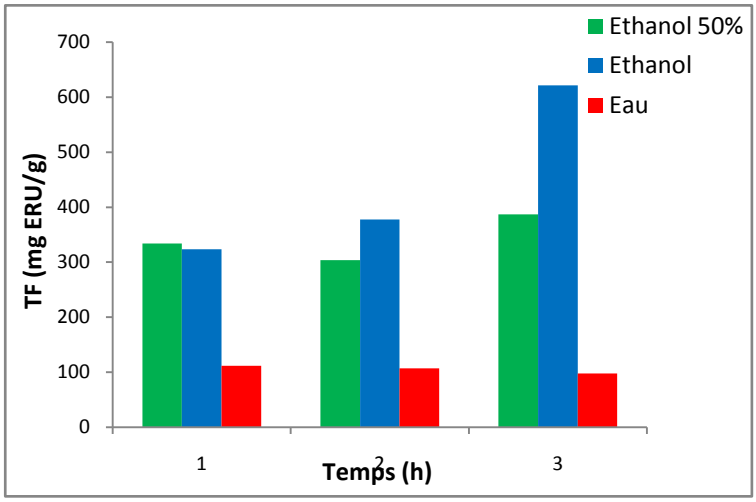


Figure IV.14 : Effet du temps sur l'extraction des flavonoïdes

La quantité des flavonoïdes extraits augmente remarquablement avec le temps pour les extraits d'éthanol. Toutefois dans les extraits d'éthanol 50% et l'eau l'augmentation est presque inaperçue. Selon l'étude de Mahmoudi et al., [95] 10 à 30 g de la poudre de fleurs d'artichaut extraites deux fois par macération à température ambiante pendant 2.5 h avec 100 ml de solvants donnent les quantités des flavonoïdes suivantes avec l'eau et l'éthanol: 12.40 ± 0.47 et 25.75 ± 0,32 mg équivalent Quercitine par gramme de poudre d'artichaut respectivement.

IV.7 COMPARAISON DES DEUX METHODES D'EXTRACTION

IV.7.1 Effet du solvant et du rapport s/l sur le dosage des polyphénols totaux.

L'effet du solvant sur l'extraction des polyphénols totaux par les deux méthodes d'extraction : par solvant à chaud (ESC) sous les conditions : s/l= 1/15, T = 40°C, t=3h, d_p=0.08mm, et extraction assistée par micro-onde (MO) sous les conditions : s/l= 1/15, puissance 400 Watt, t= 2min, d_p=0.08mm est représenté sur la figure IV.15.

Cette représentation en histogrammes montre que l'extrait d'éthanol 50% contient plus de polyphénols comparativement aux extraits d'éthanol et eau avec les deux méthodes ESC et MO et que l'extraction par micro-onde permet d'extraire des quantités plus élève que ESC avec un temps d'extraction très réduit.

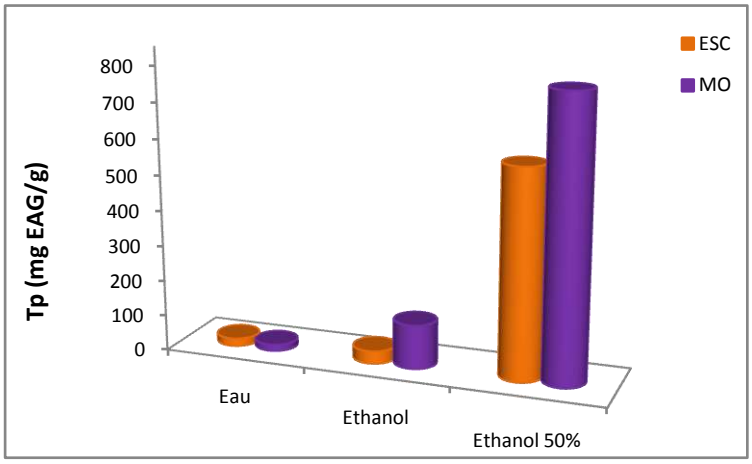


Figure IV.15 : Effet du solvant sur l'extraction des polyphénols par deux méthodes.

Cela a été confirmé par les résultats D'Alessandro et al., [29] qui ont montrés que l'utilisation de 50% d'éthanol comme solvant permet d'extraire environ deux fois plus de polyphénols par rapport à l'extraction à l'eau par la technique MO. De plus, Boggia et al., |90] ont trouvé pour une extraction MO (300Watt et t<10min, s/l=1/40, solvant= eau) 59mg EAG/100ml de polyphénols et 36 mg EAG/100ml de polyphénols par macération à chaud (T= 50°C, t<10min, s/l=1/40, solvant= eau).

L'effet du rapport (s/l) sur l'extraction des polyphénols totaux par les deux méthodes et pour les mêmes conditions (solvant= eau, s/l = 1/15, d_p=0.08mm), avec ESC : T = 40°C, t=3h et MO : puissance = 400Watt, t= 2min est présenté sur la figure IV.16.

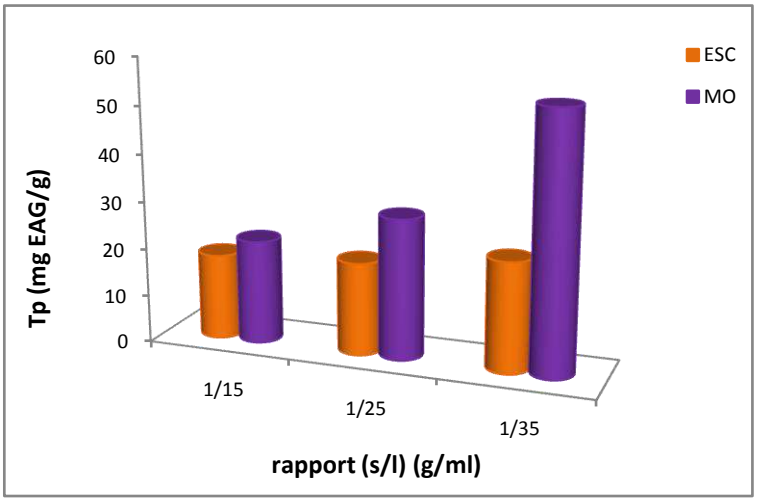


Figure IV.16 : Effet du rapport solide/liquide sur l'extraction par ESC et MO

Les résultats de la teneur en polyphénols obtenues par ESC et MO avec l'eau comme solvant montrent que l'extraction par microonde est nettement améliorée par l'augmentation du volume du solvant (diminution du rapport s/l).

Quantitativement parlant de la technique MO, la différence notée entre les teneurs en polyphénols en fonction du rapport s/l est hautement significative. On enregistre un maximum de polyphénols totaux (53.86 mg EAG/g) pour un rapport s/l = 1/35 tandis que le rapport s/l = 1/15 donne une valeur 21.83 mg EAG/g.

IV.7.2 Effet du solvant et du rapport s/l sur l'extraction des flavonoïdes

L'effet du solvant sur l'extraction des flavonoïdes par les deux méthodes a été étudié pour les conditions (solvant= eau, éthanol et éthanol 50%, s/l = 1/15, d_p=0.08mm), avec pour l'ESC : T = 40°C, t=3h et pour l'extraction MO : puissance = 400Watt, t= 2min est présenté sur la figure IV.17.

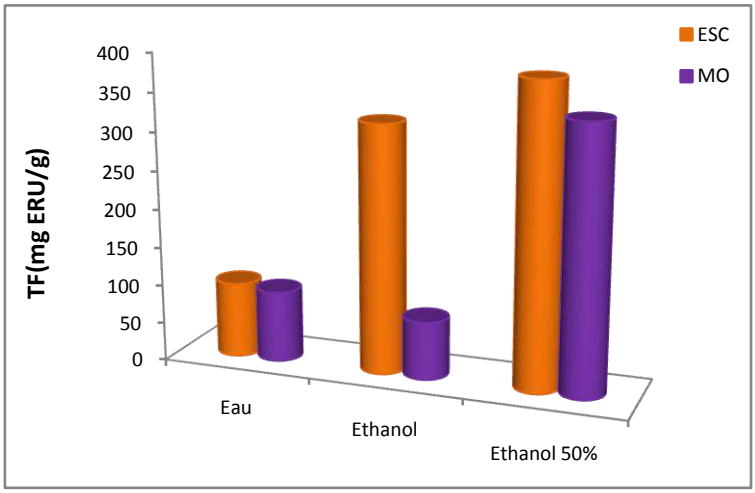


Figure IV.17 : Effet du solvant sur l'extraction des flavonoïdes par ESC et MO

En comparant l'effet des méthodes utilisées sur l'extraction des flavonoïdes à partir des écorces de grenade, nous pouvons en déduire que la teneur en flavonoïde pour ESC et MO est presque la même dans les extraits d'eau et d'éthanol 50%. Au contraire, pour les extraits d'éthanol la teneur en flavonoïdes par ESC est plus élevée que celle obtenue par MO.

D'après cette Figure on constate que la teneur en flavonoïde dans les trois extraits est dans l'ordre suivant : extrait d'éthanol 50% > extrait d'éthanol > extrait d'eau. Ce résultat

est identique à celui obtenu par D'Alessandro et al., [29], qui a montré que les mélanges éthanol-eau sont plus efficaces pour l'extraction de composés phénoliques que l'eau pure et l'éthanol pur. Cependant, Yang et al., ont montré que l'eau et les solvants à faible concentration en éthanol peuvent accéder aux cellules, mais une forte concentration d'éthanol peut provoquer la dénaturation des protéines, ce qui empêche la dissolution des polyphénols dans le solvant et influence l'extraction [107].

L'effet du rapport sur l'extraction des flavonoïdes par les deux méthodes a été étudié pour les conditions (solvant= eau, d_p=0.08mm), avec pour l'ESC : T = 40°C, t=3h et pour l'extraction MO : puissance = 400 Watt , t= 2min est présenté sur la figure IV.18.

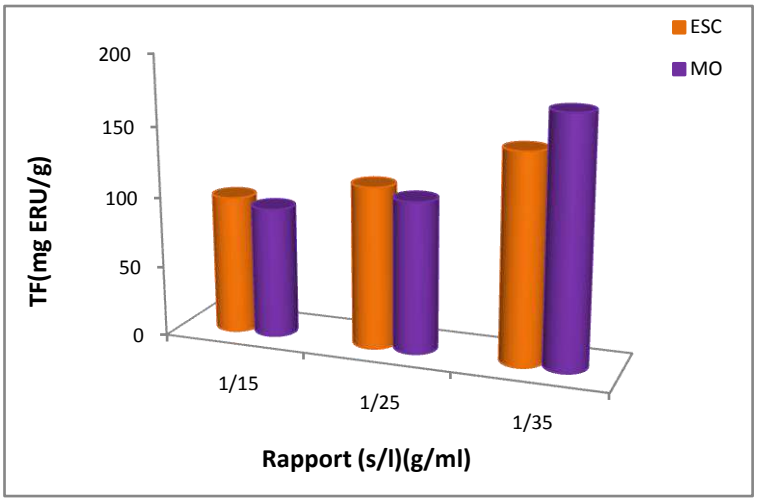


Figure IV.18 : Effet du rapport sur l'extraction des flavonoïdes par ESC et MO

Selon cette figure, les teneurs en flavonoïdes pour les trois solvants augmentent en fonction du rapport s/l. Ces résultats sont identique à celui obtenu pour la teneur en polyphénols totaux. En comparant l'effet des deux méthodes d'extraction nous pouvons en déduire que l'extraction des composés phénolique en utilisant l'eau comme solvant disponible, non toxique et moins couteux peut être nettement améliorée par l'extraction assistée par micro-onde.

IV.8 ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

IV.8.1 Test de sensibilité des souches bactériennes aux extraits de grenade

Les tests antimicrobiens ont pour but de détecter l'activité biologique de chaque extrait de grenade vis-à-vis de différents microorganismes : deux bactéries et une levure. Les résultats des tests effectués sur les extraits de grenade obtenus par ESC sous les conditions : T = 40°C, S/L= 1/15 et d_p = 0.08mm.

Tableau IV.11 : Test de sensibilité des souches étudiées aux extraits de grenade

	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)			
Souches	Eau (control)	Extrait d'Eau	Extrait d'éthanol	Extrait d'éthanol 50%
Staphylococcus aureus	0	24	20	27
Escherichia coli	0	13	15	18
Candida Albicans	0	15	11	17
Le pouvoir antimicrobien	Non inhibitrice	Légèrement inhibitrice	Légèrement inhibitrice	Modérément inhibitrice

D'après le (tableau IV.11), Le diamètre des zones d'inhibition a remarquablement augmenté en présence des extraits de grenade. Ceci reflète la présence d'une certaine activité antimicrobienne des composés phénoliques présents dans ces extraits.

L'échantillon contrôle (eau distillée) a révélé une activité nulle sur les trois souches. Extrait d'éthanol 50% présente un effet antimicrobien plus important que l'extrait d'éthanol et d'eau. Ceci est probablement lié avec la composition de chaque extrait, chose que nous avons déjà constatée dans le dosage des extraits en composés phénoliques.

Les échantillons d'eau et d'éthanol ont un effet inhibiteur très proche. Ceci peut être expliqué par le fait que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de d'autres métabolites secondaires qui ont une affinité chimique comparable vers ces deux solvants.

IV.8.2 Détermination de la CMI

Pour évaluer l'effet antimicrobien des extraits de grenade obtenus. Nous avons opté pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). La méthode que nous avons utilisée est celle de diffusion sur un milieu gélosé par la mesure des diamètres d'inhibition de la zone de croissance microbienne. Les résultats obtenus pour les différentes concentrations des extrais d'écorce de grenade obtenus par la méthode ESC sont présentés sur les figures IV.19, IV.20 et IV.21.

Sur toutes ces figures, les extraits d'eau sont notés H, ceux d'éthanol sont notés E et les extraits d'éthanol 50% sont notés **5**. Et les concentrations testées sont classées du haut (gauche vers droite) vers le bas comme suit : 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% et 3.125%.

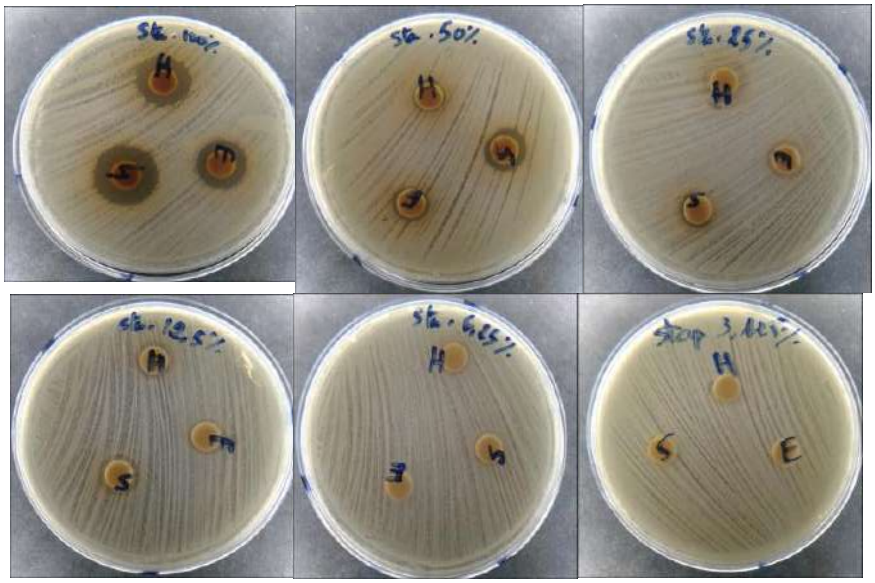


Figure IV.19: Test de diffusion pour l'extrait d'eau (**H**) d'éthanol (**E**) et d'éthanol 50% (**5**) sur *Staphylococcus aureus*.

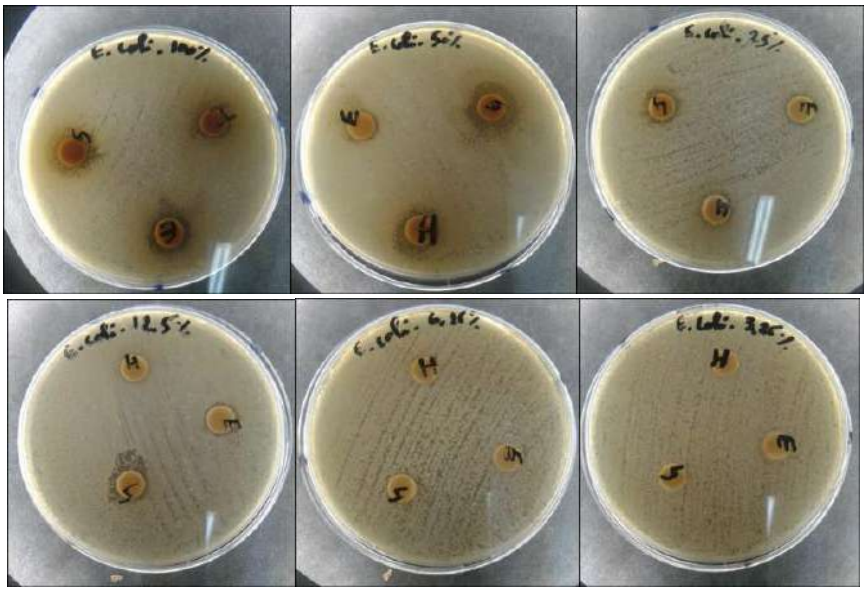


Figure IV.20: Test de diffusion pour l'extrait d'eau (H) d'éthanol (E) et d'éthanol 50% (**5**) sur *Escherichia coli*.

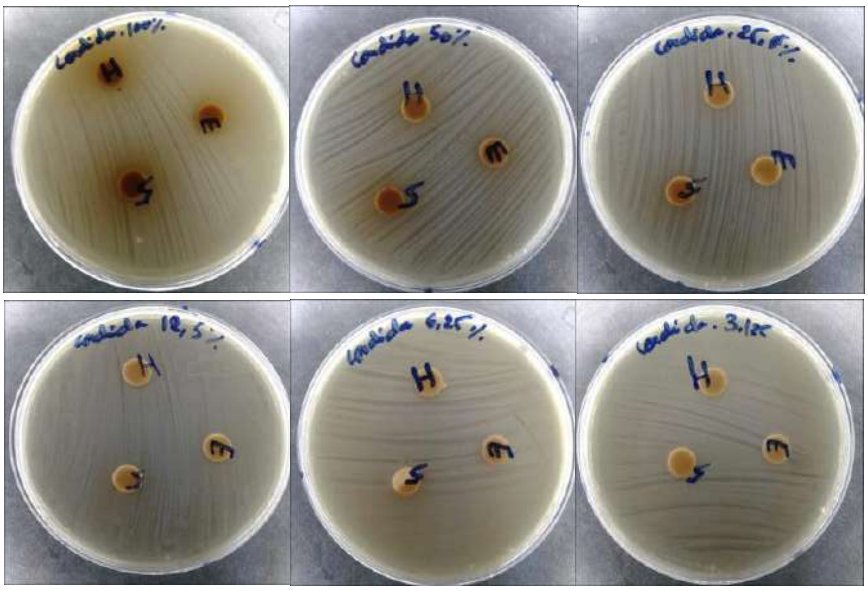


Figure IV.21 : Test de diffusion pour l'extrait d'eau (H) d'éthanol (E) et d'éthanol 50% (5) sur *Candida albicans*.

Les figures précédentes montrent que les trois souches testées découvrent des propagations ou des diffusions de forme circulaire de diamètre différents. En effet, les halos formés autours des disques imprégnés d'extraits de grenade sont clairement observés pour toutes les souches étudiées pour les fortes concentrations (> 25%).

Par ailleurs, les extraits d'éthanol 50% présentent des zones d'inhibition les plus larges, suivis par les extraits d'eau ensuite ceux d'éthanol. Concernant la réponse des trois souches aux différents extraits, la bactérie gram positif *Staphylococcus aureus* se montre la plus sensible comparé aux deux autres souches testées.

Les tracés des diamètres d'inhibition des différentes souches en fonction de la concentration de l'extrait d'eau, d'éthanol et d'éthanol 50% sont donnés dans les figures IV.22, IV.23, IV.24 respectivement.

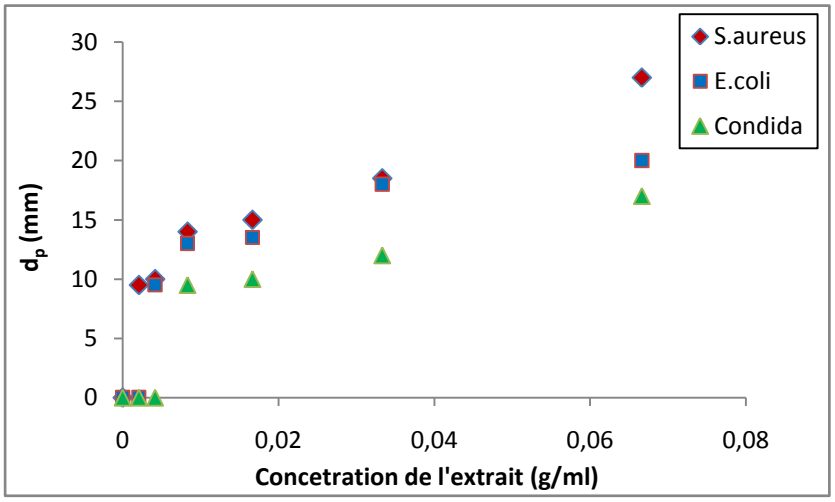


Figure IV.22 : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait d'éthanol 50%

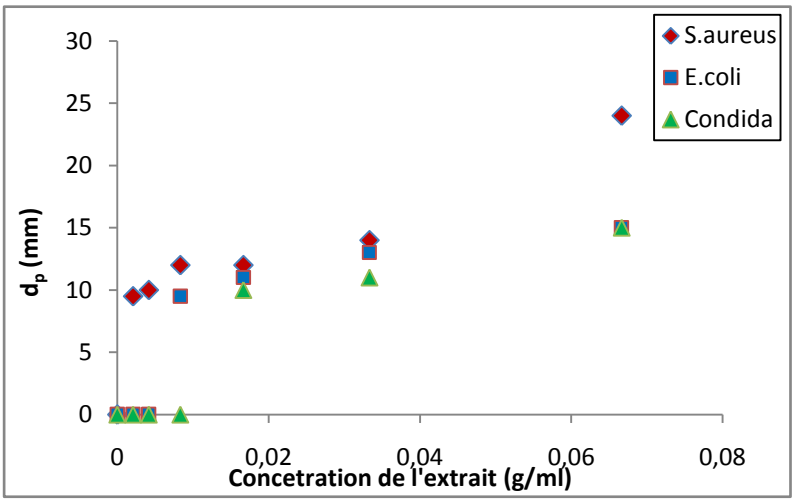


Figure IV.23 : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait d'eau.

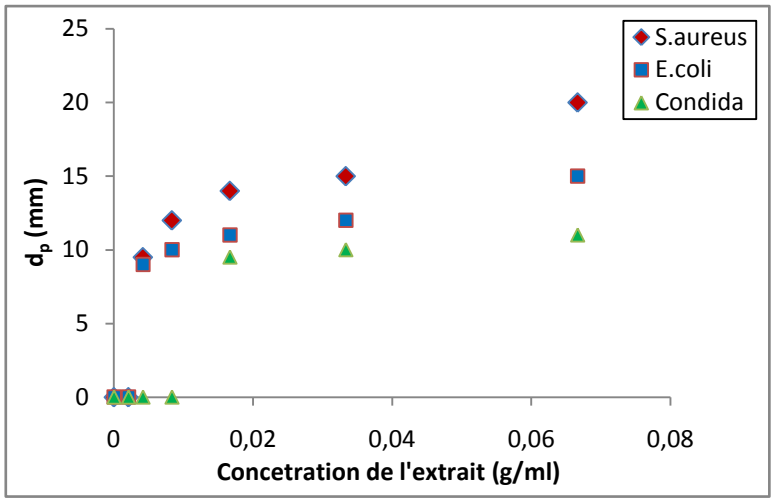


Figure IV.24 : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait d'éthanol.

Nous remarquons que les trois souches agissent différemment vis-à-vis des extraits de grenade et de manière proportionnelle avec la concentration des différents solvants.

En effet, dans le cas de l'extrait d'éthanol 50% , la *Staphylococcus aureus* présente avec *l'E.Coli* les valeurs les plus élevées de diamètre de zones d'inhibition suivi par la levure *Candida*. Cependant, dans le cas de l'extrait d'eau *Staphylococcus aureus* présente des diamètres très élevés comparée à *l'E. Coli* et la levure *Candida* qui a presque les mêmes valeurs de diamètre d'inhibition. Et dans le cas de l'extrait d'éthanol le même comportement est observé pour les trois souches, sauf que *Staphylococcus aureus* présente des diamètres un peu supérieurs à ceux de *l'E. Coli*. Ainsi, tous les extraits de grenade se révèlent actifs vis-à-vis des trois souches étudiées.

Dans une étude menée sur les extraits de grenade Ibrahium [108], reporte que *l'E. Coli* présente une sensibilité très élevée envers les trois extraits de grenade (acétone, méthanol et eau) en ayant le diamètre d'inhibition le plus élevé dans l'extrait de méthanol. Aussi, Tianchai a abouti aux diamètres d'inhibition 29 mm pour l'*E. coli* et 34 mm pour la *S. aureus* en présence d'un extrait d'éthanol et 27 mm (*E. coli*) et 30 mm (*S. aureus*) pour un extrait d'eau [109].

Une estimation approximative de la CMI des différents extraits a donné les valeurs présentées dans le tableau IV.12.

La lecture de ce tableau, révèle que l'extrait d'éthanol 50% est le plus actif biologiquement vis-à-vis des deux microorganismes *S. aureus*, *E. coli* présentant une CMI de 2.08 mg/ml, qui est la CMI la plus faibles. Et pour la levure *Candida* une CMI de 8.33 mg/ml.

Cependant, l'extrait d'eau est aussi actif vis-à-vis des microorganismes étudiés avec une CMI qui varie entre 2.08 et 16.66 mg/ml. Et dans le cas de l'extrait d'éthanol qui est le moins actif biologiquement vis-à-vis des trois microorganismes étudiés, les CMI sont comprises entre 4.16 et 16.66 mg/ml. Comparées à celles obtenues par Tianchai et al., 207 et 104 mg/ml dans un extrait d'eau et 499 et 242 mg/ml dans un extrait d'éthanol pour *l'E. Coli* et *Staphylococcus* respectivement [109]**,** nous résultats sont meilleurs. Ceci reflète la concentration élevée en polyphénols des extraits obtenus et par la suite « l'efficacité du procédés pour les conditions choisis ».

Tableaux IV.12: Valeur de la CMI (mg/ ml) des extraits de grenade.

Souche / Extrait	*S. aureus*	*E. coli*	*Candida*
d'éthanol 50%	2.08	2.08	8.33
d'eau	2.08	8.33	16.66
d'éthanol	4.16	4.16	16.66

Les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne effectuée sur les extraits de grenade obtenus par extraction par solvant à chaud sont les suivant :

- Tous les extraits des écorces de grenade ont un pouvoir antimicrobien, et les trois souches étudiées : *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et la levure *Candida* sont modérément (intermédiaire) sensibles
- Parmi tous les extraits de grenade, l'extrait d'éthanol 50% montre la plus forte activité antimicrobienne vis-à-vis des trois microorganismes étudiés.
- Les extraits d'eau et d'éthanol sont aussi très actifs sur la souche : *Staphylococcus aureus*.

- L'activité antimicrobienne en face de des trois microorganismes étudiés augmente avec la concentration de l'extrait d'écorce de grenade.
- Les valeurs approximatives de CMI obtenues pour les extraits d'eau, d'éthanol 50% et d'éthanol sont comparables à ceux qui existent dans la bibliographie.

IV.9 ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTEE

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le tri des molécules dotées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits de matières végétales.

Les résultats obtenus pour le pouvoir antioxydante des extraits de grenade obtenus par les techniques ESC (solvant= eau et éthanol, s/l= 1/35, d_p=0.08mm, T = 40°C, t=3h) et EMO (solvant= eau, s/l= 1/35, d_p=0.08mm, puissance = 400 Watt , t= 2min) sont présentés sur la figure IV.25.

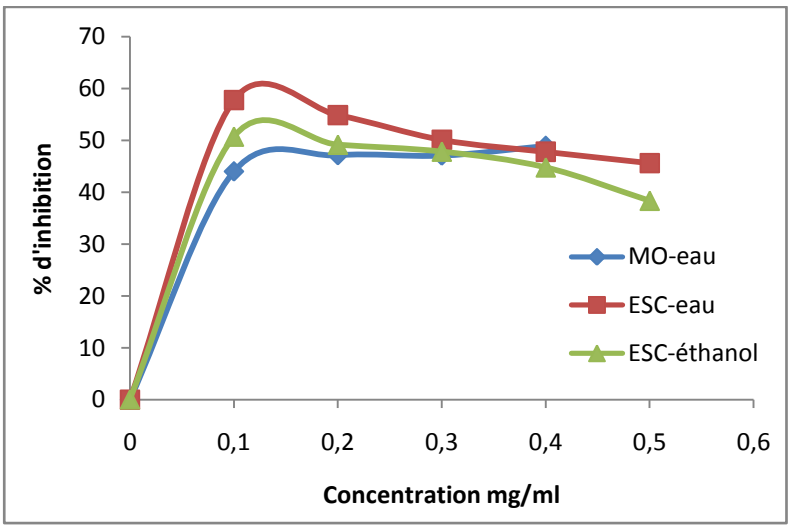


Figure IV.25 : Activité antioxydante des extraits d'écorces de grenade

Selon cette figure, les trois extraits testés par le $DPPH^{\bullet}$ montrent un effet antioxydante comparable. Ceci dit, un changement de couleur du violet vers le jaune a été visiblement observé pour ces extraits.

La valeur de la concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres (CI_{50}) est comprise entre 0.1 et 0.2 mg/ml. Ce résultat est du même ordre que celui obtenu par Rajan et al., [45] , qui ont publiés des valeurs de 105.93 et 135.27 µg/ml obtenues par une macération à froid des écorces de grenade par éthanol et eau respectivement.

Ainsi, les extraits des écorces de grenade obtenus par les deux méthodes peuvent être qualifiés d'antioxydantes efficaces.

Conclusion générale

Certain sous produits agro- industriels tels que les écorces de grenade sont des sources importants de composés phénolique qui ont de bonnes activités antioxydante et antimicrobienne ces composés peuvent être extraits par des méthodes conventionnelle ou modernes.

Dans ce travail de master, on s'est intéressé à étudier l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces de grenade par deux méthodes; à savoir : une méthode classique qui est l'extraction par solvant à chaud, et par une méthode innovante qui est l'extraction assistée par micro-onde.

Les résultats obtenus sont classés en quatre parties :

Dans la première partie les résultats de la caractérisation de la matière végétale utilisée sont présentés, comme la granulométrie, et les propriétés organoleptiques de la poudre des écorces après broyage. Aussi, les propriétés organoleptiques des extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction en utilisant différents solvants, ainsi que leurs pouvoir tensioactif ont été déterminés. Les résultats obtenus ont montré que les trois extraits de grenade sont homogènes et contiennent certainement des molécules ayants les propriétés des saponines.

La deuxième partie a été consacrée en premier lieu à l'extraction à chaud et par micro onde des écorces de grenade de diamètres différents (80µm et 100µm et 160) par l'éthanol, Où, le rendement de l'extraction par chauffage simple a été déterminé.

Pour un diamètre de particules égale 0,08mm, un rapport s/l= 1/15, T= 40°C, et un temps t=3h, un rendement maximal a été obtenu (29.95%) par une extraction avec l'éthanol.

L'analyse quantitative des extraits de grenade par spectrophotométrie UV-Vis est à la base de la troisième partie. Les résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes et leur dépendance avec les paramètres d'extraction sont récapitulés dans cette partie. Quel que soit le mode d'extraction, l'éthanol 50% reste le meilleur solvant extracteur des polyphénols totaux et de flavonoïde. En effet, 582 et 783 mgEAG /g ont été obtenus par ESC et MO respectivement. Et 387, et 341mgERU/g sont extraites par les méthodes ESC et MO respectivement. L'éthanol 50% est préférable car il a l'avantage d'être non polluant, moins chers et non toxique par rapport à d'autre solvant comme l'éthanol pur.

L'activité antimicrobienne des différents extraits et la détermination de la CMI fait l'objet de la quatrième partie. Les tests de diffusion en phase solide ont montré un diamètre des zones d'inhibition remarquable possède les composés phénoliques présents dans ces extraits. L'Extrait d'éthanol 50% présente un effet antimicrobien plus important que l'extrait d'éthanol et d'eau sur les trois microorganismes étudiés, surtout sur la souche *Staphylococcus aureus*. De plus, l'extrait d'éthanol 50% est le plus actif biologiquement avec une CMI de 2.08 mg/ml , qui est la CMI la plus faibles, vis-à-vis des deux microorganismes *S. aureus, E. coli, et* avec la levure *Candida* une CMI de 8.33 mg/ml.

Ce résultat est du même ordre que celui obtenu par Rajan et al., [45] , qui ont publiés des valeurs de 105.93 et 135.27 µg/ml obtenues par une macération à froid des écorces de grenade par éthanol et eau respectivement.

En outre, les extraits des écorces de grenade obtenus par les deux méthodes peuvent être qualifiés d'antioxydantes efficaces. Avec une valeur de concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres (CI_{50}) comprise entre 0.1 et 0.2 mg/ml.

De ce fait, Les perspectives envisagées pour cette étude sont les suivantes :

- Continuer l'étude sur cette espèce (l'écorce ou autre partie de ce fruit) par d'autres méthodes d'extraction (Soxhlet, extraction assisté par ultrason,…).
- Identification des différents constituants des extraits de grenade par des méthodes d'analyse plus poussées comme la HPLC et la CCM.
- Etude de l'activité antidiabétique et inflammatoire des extraits de grenade.

Références Bibliographiques

[1] Bidri M ;Choay P, Regain d'intérêt pour la grenade un fruit majestueux aux multiples propriétés, Article, hôpitaux universitaires la Pitie – Salpêtrière- Charles –Foix, 2016.

[2] Reay T, Food in History, Three Rivers Press, États-Unis, 1988.

[3] Dauzat A; Dubois J; Henri M, Nouveau dictionnaire étymologique et historique, Librairies Larousse, France, 1971.

[4] Kiple Denneth F; Ornelas K.C, the Cambridge World History of Food, Cambridge University Press, Grande-Bretagne, 2000.

[5] Société Française des Antioxydants, cite d'internet http://www.sfa-site.com/?q=node/235, 29/03/2017, 16:23.

[6] Wald E, Le grenadier (Punicagranatum): plante historique et evolutions thérapeutiques récentes, Thèse Doctorat en Pharmacie, Université Henri Poincare - Nancy 1, 2009.

[7] Hmid I, Contribution a la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (punica granatum L): caracterisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais, thèse doctorat, L'université Nantes d'Angers mans (France), 2013.

[8]Aouna O ;Touatia N ;Boussalaha N ; Merzouka H.M ; Chibane M, aAlcaloïdes et minéraux de l'écorce des Variétés locales de grenades « Punica granatum L.», article,Université A.Mira de Béjaia ,2011.

[9] Neef R, PlantenOpgravingen te Deir Alla in de Jordaanvallei Leiden,Rijksmuseum van Oudheden, 30-37,1989.

[10] Ángel C.S ; Ángel A ; Carbonell B,Jus de grenadecultivée en Espagne punicalagine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans l'alimentation fonctionnelle du futur, Universidad Miguel Hernández, Département de Technologie Agroalimentaire.

[11] Planchon G ; Collin E, Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale, Librairie F. Savy, Tome I. Pages 235-236 et 307-308, 1875.

[12] Belkacem H, Extraction et évaluation de la qualité de l'extrait des écorces de Grenade, Mémoire de Fin d'Etudes pour l'Obtention du Diplôme de master, Université Dr. Yahia Fares de Medea, 2015.

[13]Spichiger R.E ; Savolainen V ; et al, Botanique systématique des plantes à fleurs, Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales, Editions Presses polytechniques et universitaires romandes, Troisième édition, 413 pages, 2004.

[14]Courchet L.D.J, Traité de botanique : comprenant l'anatomie et la physiologie végétales et les familles naturelles à l'usage des candidats au certificat d'études physiques chimiques et naturelles des étudiants en médecine et en pharmacie, Editions Baillière, 1320 pages. Pages 1019-1023, 1897.

[15]Amouretti M.C ; Comet G, Cahier d'histoire des techniques, Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens, Publications de l'université de Provence, 174 pages, Page 81, 1992.

[16] Boullard B, Plantes médicinales du monde, Réalités et croyances, Editions Estem, 636 pages, Pages 437-438, 2001.

[17] Institut National De La Recherche Agronomique D'algérie, Deuxième rapport national sur l'état des Ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture, INRAA / Juin, p. 68, Algérie,2006.

[18] Melgarejo P, Seleccion y tipificacion varietal de granado (Punica granatum L.) [Ph.D. thesis] , Valencia. Spain: Univ. Politecnica de Valencia (UPV), 1993.

[19] Gil M .I ;Barbara F.A ; Hess-pierce B ;Holcroft D ; Kader M, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 4581-4589, 2000.

[20] National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28 slightly revised May, Basic Report 09286, Pomegranates, Report date: May 05, 2017 13:06

[21] Chahnez S, Effet de l'Irradiation sur les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes & cytoprotectrices de l'écorce de Punica granatum, Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master professionnel en sécurité sanitaire des aliments, université de Carthage, 2013.

[22] Muanda F.N, Identification De Polyphénols,Evaluation De Leur Activité Antioxydante Et Etude De Leurs Propriétés Biologiques, Thèse De Doctorat, L'université Paul Verlaine-Metz, 2010.

[23]Athamena S, Etude quantitatives des flavonoïdes des grains de Cuminumcyminum et les feuilles de Rosmarinusofficinalis et l'évaluation de l'activité Biologique, Thèse de Magister, Université de Batna, 2009.

[24] Heller W, Forkmann G, The flavonoïdes Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products, Encyclopedia of plant physiology, Ed. Chapman & Hall, London, 399-425, 1993.

[25]Khacheba I, Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha – amylase, Ingénieur d'Etat en Biologie, Université Amar Telidji – Laghouat, 2008.

[26] Crozier A, Classification and biosynthesis of secondary plant products: In Plants" Diet and Health". Ed. Goldberg, an overview, pp: 27- 48, 2003.

[27] Luchese R .H, Prudêncio E .R, Fioravante G.A, Honey Analysis, Honey as a Functional Food. Chapter 13, pp: 296-288,

[28] Robert D ; Hrvoje J ; Vanja Vasiljev M ;Vladimir-Knežević S, Cvijanović O ;Tadić Z ; Romić Z ; Dario R , differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in ccl4-intoxicated balb/cn mice, article, acta pharmacologica sinica 33: 1260–1270,2012.

[29]D'Alessandro L .G,Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits,Thèse de Doctorat, Université Lille 1, 2013.

[30] Vaca-Garcia C, Composite à base de PVC et de fibres végétales, Toulouse, Bulletin 2009/06.

[31] Ramaroson A ;Roul G, Médicament a base de flavanols pour le traitement et/ou la prévention de la restenose endoprothetique et la maladie atheromateuse chez des patients coronariens,Brevet, EP1765372 A1, 28 mars2007.

[32]Alkurd A ; Hamed T. R ; Al-Sayyed H, Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan, Jordan Journal of Agricultural Sciences,4: 265 - 274. 149, 2008.

[33] Fleuriet A ; Jay-Allemand C ; Macheix J.J, Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique, Presses polytechniques et universitaires romandes, pp 121-216. 132, 2005.

[34] Adlercreutz H ; Mazur W, Phyto -œstrogènes and Western diseases, Annals of Médicine, , 29:95-120 , 1997.

[35]Saleem M ; Kim H.J ; Ali M.S ; Lee Y.S, An update on bioactive plant lignans. Natural Products Reports, 22:696-716, 2005.

.

[36]Manach C ; Scalbert A ; Morand C ; Jiménez L, Polyphénols: food sources and bioavailability, American Journal of Clinical Nutrition, 79:727 – 747, 2004.

[37] Roy E, les plantes exotiques dans les cosmétiques : réelle intérêt ou effet marketing, thèse Doctorat, Université de Nantes, 2013.

[38] Elanie Spilmont M, Intérêt de la grenade dans la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose : rôle des fractions lipidiques et polyphénoliques, approches physiologiques, cellulaires et moléculaires, Médecine humaine et pathologie,thèse Doctorat, Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2013.

[39]Jordan G, Exercice physique et progression du cancer de la prostate, Effets combinés avec la prise d'antioxydants naturels ou la radiothérapie externe : identification de voies de signalisation redox-dépendantes, thèse doctorat, Université Rennes 2 , 2015.

[40] Julie J, Therapeutic Applications of Pomegranate (Punica granatum L.), A Review, Alternative Médicine Review Volume 13, Number 2, 2008.

[41] Ben Abdennebi M A, Le grenadier tunisien (Punica granatum) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C_2C_{12} via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK. Mémoire de Maîtrise. Université de Montréal, 2012.

[42]Basu A, Penugonda K, Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice, Nutr Rev 67(1):49-56, Jan 2009.

[43] Anahita A ; Asmah R ;Fauziah O, Antioxidanteffect of pomegranate against treptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats, Toxicology Reports 1, 915–922, 2014.

[44] Akhtar S ; Tariq I ; Fraternale D ; Piero S, Pomegranate Peel and peel extracts: Chemistry and food features, Review, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Sciences and Technology, Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan, Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino Carlo B', Via Saffi, 2, 61029 Urbino, PU, Italy, 12 May 2013.

[45]Rajan S ; Mahalakshmi S ; et al, antioxydant potentials of punica granatum fruit rind extracts, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 3, Issue 3, 2011.

[46]Ribeiro M.A ; Bernardo M ;Gil G ;Esquıvel M.M ; Melissa officinalis L,: study of antioxidant activity in supercritical residues, Journal of Supercritical Fluids, 51 –6021, 2001.

[47]Ullah N ; Javid A ;Farhat A.Kh ; Khurram M ; Arshad H ; Inayatur R, Proximate Composition Minerals Content Antibacterial and antifungal Activity Evaluation of Pomegranate (Punicagranatum L.) Peels Powder Middle-East, Journal of Scientific Research,11 (3): 396-401, 2012.

[48]Saleha A ; Amit S ; et al, Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of rind of Punicagranatum; international journal of advances in pharmacy, biology and chemistry, vol (3), July- Sep 2014.

[49] Brito AF ; Ribeiro M ; Abrantes AM ; et al, Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional the- rapeutics, Curr Med Chem 22:3025–39,(2015).

[50]Ackland ML ; Waarsenburg S ; Jones R, Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines In Vivo, 19:69–76,(2005).

[51] Kaufmann S ,Host response to intracellular pathogens, Ed. Springer ; R.G. Landes, New York Austin, p. 345,1997.

[52] Cowan M. M, Plant Products as Antimicrobial Agents, ClinMicrobiol, Rev 12: 564-582, 1999.

[53] Wei Z ; Jianke L ; et al, In vitro steatosis hepatic cell model to compare the lipid-lowering effects of pomegranate peel polyphenols with several other plant polyphenols as well as its relatedcholesterol efflux mechanisms, Toxicology Reports 1, 945–954 ,2014.

[54] Selvaraju S ; Nady B ; et al, Long-term (15 mo) dietary supplementation with pomeganates from Oman attenuates cognitive and behavioral deficits in a transgenic mice model of Alzheimer's disease, Nutrition 31, 223–229, 2015.

[55] Pei-Tzu W, Effects of pomegranate extrait supplementation on cardiovascular disease risk and physical function in patients with chronic renal failure, Thèse Doctorate de philosophie en Kinesiologie, Graduate College, University of Illinois, Urbana-Champaign, USA, 2013.

[56] Benzeggouta N, Evaluation des Effets Biologiques des Extraits Aqueux de Plantes Médicinales Seules et Combinées, Présentée en vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences. Université Mentouri-Constantine, 2015.

[57] Aslam M.N ; Lansky E.P ;Varani, J, Pomegranate as a cosmeceutical source, pomegranate fractions promoteproliferation and procollagensysthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. J. Ethnophar-macol, 103, 311–318, 2006.

[58]Afaq F ; Zaid M.A ; et al, Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconsti-tuted skin, Exp, Dermatol, 18, 553–561, 2008.

[59]Tiwari H.C ; Singh P ;Mishra P.K ;Shrivastava P, Evaluation of Various Techniques for Extraction of Natural Colorants fromPomegranate Rind Ultrasonic and EnzymeAssissted Extraction. IJFTR, 35: 272-276, (2010).

[60] Bendjabeur S, Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade punicapranatun L.) en vue de leur utilisation alimentaire. Thèse Magister .Ecole Nationale Supérieure Agronomique Al-harach-Alger, 2012.

[61] Lucchesi M E, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse doctorat, Université de laRéunion, 2006.

[62] Chemat F, Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris, 2011.

[63]Cheigh, C.I ;Chung, E.Y ;Chung, M.S, enhanced extraction of flavanones shesperidin and narirutin from citrus unshiu peel using subcritical water, journal of foodengineering. 110, 472-477,2012.

[64]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, 2008.

[65] Baba-Aïssa F, Encyclopédie des Plantes Utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident,EDAS Algérie,2000.

[66] Kraft K ; Hobbs C,Pocket Guide to Herbal Medicine, Thieme, Stuttgart, New York. p16, 2004.

[67] Ben Amor B, 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,28/01/2008.

[68] Carnat A.P ; Carnat A ; Fraisse D ; Ricoux L ; Lamaison J. L, The aromatic, polyphenolic composition of lemon balm (Melissa officinalis L, subsp Officinalis) tea,Pharmaceutica Acta Helvetiae, 72 (5), 301-305,1998.

[69] Ivanov Penchev P, étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions ,Thèse en vue de l'obtention dudoctorat de l'université de Toulouse,2010.

[70]Forina M ; Lanteri S ; Armanin C ; Casolino C ; Casale M ;ParvusV, Available online: http://www.parvus.unige.it 2010 (accessedle 13 October 2016).

[71]Chemat F ;AbertVian M ;Cravotto G, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles, International Journal of Molecular Sciences 13, 8615-8627, 2012.

[72] Schott Technical Glass Solutions GmbH, Catalogue, Schott-greate, mainz west germany, page3. (http://www.schott.com/nexterion), May 2017.

[73] Chemat F ; Huma Z ; Khan M.K, Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, UltrasonincsSonochemistry, 18, 813-835,2011.

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

[75]Lygeri P ; Kyriakos K ; Athanasia M. G ; Konstantinos A, Optimization of polyphenols extraction from pomegranate peels – drying, enzymatic pretreatment, extraction method, operating conditions, article, University, 541 24 Thessaloniki, Greece ,2010.

[76]Cai-ping Z ; Xi-chuan Z ; Lin-qiang L ; Xiao-xia W ; Bing L, Response surface optimisation of ultrasound-assisted polysaccharides extraction frompomegranatepeel; Food Chemistry 177 , 139–146, 2015.

[77] Inoue T ; Tsubaki S ; Ogawa B ; Onishi K ; Azuma J, Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unship fruits by microwave-assisted extraction. Food Chemistry, 123, 542-547, 2010.

[78] M'hiri N, Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone,Thèse doctorat. Université de Lorraine, 2015.

[79]Zhenbin W ; Zhongli P, Extract of Phenolic From Pomegranate Peels, The Open Food Science Journal,5, 17-25,2011.

[80]SparrEskilsson C ; Björklund E ;Analytical S, microwave-assisted extraction, Journal of Chromatography A, 49 : 415-420, 2000.

[81]Yilmaz Y ; Toledo R.T, Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols, Journal of Food Composition and Analysis, 19:41-44, 2006.

[82]Pinelo M ; Del Fabbro P ; Marzocco L ; Nunez M.J ; Vicoli M.C,Optimisation of continuous phenol extraction from Vitisvinifera By-products, Food Chemistry, 92:109-117, 2005.

[83]DibertK ;Cros E, Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee, Part II: Kinetic data, Journal of Food Engineering, 10(3):199-214,1989.

[84]Bucic-Kojic A ; Planinic M ; Tomas S ;Bilic M ; Velic D, Study of solid liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds, Journal of Food Engineering,81:236 242,2007.

[85]Mafart P ; Béliard E, Génie Industrial Alimentaire, Tome II : Technique Separatives, Editions Tec & Doc, Lavoisier, ISBN : 2-85206-808-7, 1992.

[86]Lehtinen P ;Laakso S, Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber, Journal of the Agricultural and Food Chemistry, 46, 4842-4845,1998.

[87] Mutahar S. S ;Mutlag M. AO ; Najeeb S. AZ, Antioxidant Activit1y of Pomegranate (Punicagranatum L.) Fruit Peels, Food and Nutrition Sciences, 3, 991-996, 2012.

[88] Pharmacopée Européenne, 2001.

[90]Boggia R ;Turrini F ; Villa C ; Lacapra Ch ;Zunin P ;Parodi B, Green Extraction from Pomegranate Marcs for theProduction of Functional Foods and Cosmetics, Article, University of Genoa,2016.

[91]Abbasi H ; Karamatollah R ;Emamdjomeh Z ; Seyyed M ; Ebrahimzadeh M, Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil, Research Paper, University of Tehran, Karaj, Iran, 2008.

[92]Athanasia M G ;Ververi M ;Adampoulou A ;Kyriakoskaderides,Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils, journal Aristotle University, 2016.

[93] Ju Huang A ;Weiping He ; Chen Yan ;Xihua Du and Xiaoqin Shi, microwave assisted extraction of flavonoids from pomegranate peel and its antioxidant activity article ,2017.

[94]Ghomari F; Bendi-Ouis A ; science des materiaux de construction, Universite Aboubekr Belkaid, 2007 – 2008.

[95] Mahmoudi S ; KhaliM, MahmoudiN, Etude de l'extraction des composes phénolique des de déférents parties de fleur d'artichaut (Cynara scolymus L.), Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09. 35 -40 ,Juin 2013.

[96] Anthony L, How It Works: Du Noüy Tensiometer, Shaw Research Group, 2013.

[97]Bessas A, Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien, mémoire online, Université Djillali Liabes -Sidi Bel Abbes,2008.

[98] Boizot N ; Charpentier J.P, Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, publication, 2006.

[99] Ayoola G. A ; Ipav S. S ; et al, Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of Allanblackia floribunda oliv (Guttiferae), International

journal of healthresearch, 1 (2):81-93, 2008.

[100] Noureddine A ;Saidat B ; Boulanouar B ;Maatallah M, étude comparative des indices d'activité antioxydante des essais du cérium et du DPPH: application sur trois plantes médicinale locale, International Journal of Innovation and AppliedStudies,Vol. 13 No. 3, Nov. 2015 .

[101] Ammar R. B ;Bhouri W ; Sghaier M. B ; Boubaker J ; Skandrani I ; Neffati A ; Bouhlel I ; Kilani S ; Mariotte A. M ;Chekir-Ghedira L ;Dijoux-Franca M. G. Ð ;and Ghedira K, Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of Rhamnus alaternus L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. Food Chem,116: 258-264 ,2009.

[102] Benjilali A ; Tantaoui-Elaraki A ;Ismaïl-Alaoui M ;Ayadi A, méthode d'étude des Propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé, Plantes médicinales et phytothérapie, 20,155-167, 1986.

[103] Broadasky T. F ; Lewis C ; Eble T. E, Bioautographic thin layer chromatophic analysis ofantibiotics and their metabolites in the whole animal, I Clindamycin in the rat, J, Chromatogr,123: 33-44,1976.

[104] Bauer A .W ; Kirby W. M ; Sherris J C ;Turck M, Antibiotic susceptibilitytesting by a Standardized single disc method, Am, J, Clin, Pathol, 45: 493-496,1966.

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

[106] Rawahi A ; Giles E ; et al, Phenolic Constituents of Pomegranate Peels (Punicagranatum L.) Cultivated in Oman, European Journal of Medicinal Plants, 4(3): 315-331, 2014.

[107] Yang L; Jiang J.G; Li W.F; Chen J; Wang D.Y;Zhu L, Optimum extraction process of polyphenols from the bark of Phyllanthus emblica L.based on the response surface methodology, Journal of Separation Science, 32, 1437-1444,2009.

[108] Ibrahium M.I, Efficiency of Pomegranate Peel Extract as Antimicrobial, Antioxidant andProtective Agents, World Journal of Agricultural Sciences, 6 (4): 338-344, 2010.

[109] Tianchai N ; Petlada D ;Sukon T, Antibacterial activity of pomegranate fruit peels andarils , Science Asia 38, 319–322,2012.