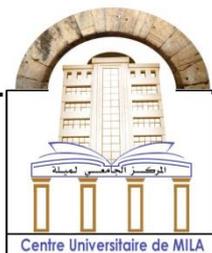


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N°Ref :.....

**Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF- Mila**

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

**Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de**

**Master**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

**Etude phytochimique et évaluation biologique de  
*Punica granatum L.* et *Carthamus tinctorius L.* et un  
colorant azoïque.**

Présenté par :

- KHIDOUR Aziza
- MEKHOLOUF Hanane

Devant le jury :

|                          |                                    |                  |
|--------------------------|------------------------------------|------------------|
| <b>Khannaoui Badis</b>   | (MCA) Centre universitaire de Mila | <b>Président</b> |
| <b>Menakh Mouna</b>      | (MAA) Centre universitaire de Mila | <b>Examineur</b> |
| <b>Bougueria Hassiba</b> | (MCA) Centre universitaire de Mila | <b>Promoteur</b> |

**Année Universitaire : 2021/2022**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ﴾

[سورة عبس الآية 24]



## *Remerciement*

*Tout d'abord, nous remercions **Dieu Tout-puissant** de nous avoir donné la volonté, la puissance, et de la santé ainsi que le courage de dépasser toutes les difficultés, grâce à son aide nous avons réalisées ce modeste travail.*

*La première personne que nous tenons à remercier très sincèrement et chaleureusement est M<sup>elle</sup> **BOUGEURIA Hassiba**, enseignante au Centre Universitaire Abdelhafid Boussoufde Mila, pour sa confiance et ses encouragements qui nous ont poussés à persévérer dans le chemin de la recherche...merci à vous.*

*Nous remercions également Monsieur Khannaoui Badis, enseignant au Centre Universitaire Abdelhafid Boussoufde Mila pour l'honneur qu'il nous a fait d'accepter de présider notre jury.*

*Ainsi que Madame Menakh Mouna enseignante au Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila d'avoir accepté dévaluer notre travail en tant qu'examinatrice.*

*Nous tenons également à exprimer notre gratitude et nos remerciements à tous les enseignants de la filière de Biologie du Centre Universitaire de Mila, pour leurs conseils et leurs orientations.*

*Nous remercions également toute l'équipe des laboratoires des sciences de la nature et de la vie du Centre Universitaire de Mila, qui nous a aidé à réaliser ce travail.*

*Nous adressons également nos sincères remerciements à tous les membres de notre famille et à nos amis pour leur amour et leur soutien.*

*Enfin, un grand merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



## *Dédicace*



*Je dédie ce mémoire*

*A mes chers parents ma mère et mon père pour leur  
patience, leur amour, leur soutien  
et leurs encouragements.*

*A mes frères.*

*A mes amies et mes camarades, sans oublier tous les  
professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du  
secondaire ou de l'enseignement supérieur.*

***MEKHOLOUF Hanane***





## Dedicace

وقل ربي ارحمهما كما ربياني صغيرا

الوحيد في العالم الذي يأخذ من نفسه ليعطيني قد لا يكون أعطاني كل ما أتمناه

لكنه أعطاني كل ما يملك

إلى البعيد جدا الذي لم تصله كلماتي إلى الذي غادرني دون أن يرى ما وصلت إليه

بفضل الله عزوجل وبفضله الكبير ودعمه

لو كان العمر يهدى لكان عمري فداه إليك والدي الغالي .....أنا أفتقدك اللهم لا

تحرم أبي من الجنة فهو لم يحرمني شيئا في الدنيا

اللهم ارحمه رحمة الأبرار

إلى والدتي الصابرة أطال الله في عمرها

عندما أتكلم عن أمي فأنا أتكلم عن عالم عن دنيا عن جنة عن وطن كبير وعن

حب لا يموت أبدا

إلى شمعتي المضيئة احمد

إلى جميع أخواتي وإخواني الكرام الطيبين هدى فاطمة مليكة ومحمد وعبدالباسط.

أهديكم هذا العمل

خيزور عزيزة



## Résumé :

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une étude comparative de l'activité antibactérienne et antioxydante de deux plantes médicinales utilisées comme colorants naturels (*Punica granatum* L. et *Carthamus tinctorius* L.) avec un colorant azoïque synthétique, en plus de mener une étude phytochimique utilisant les deux plantes précédentes.

Les tests phytochimique de différents extraits réalisés au cours de cette étude ont révélé la présence de différentes familles de composés chimique de métabolites secondaires existant à des teneurs variables.

Le rendement des extraits méthanolique, éthanolique, et aqueux des plantes étudiées *Punica granatum* L. Et *Carthamus tinctorius* L. est de (49 %, 24%, 42% pour le *Punica granatum* L.) et (37%, 86%, et 25% pour le *Carthamustinctorius* L.) respectivement.

Le dosage des polyphénols totaux montre que le teneur en phénols totaux est de l'ordre (**1,178 ± 3,77 mg EAG/g** et de **0,432 ± 0,23 mg EAG/g**) pour la *Punica granatum* L. et de (**1,906 ± 18,85 mg EAG/g**, et **0,082 ± 0,40 mg EAG/g**) pour le *Carthamus tinctorius* L. dans les extraits méthanolique et éthanolique.

L'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de DPPH, la concentration inhibitrice à 50 % (IC<sub>50</sub>) a été enregistrée à 15 min pour *Punica granatum* L, *Carthamus tinctorius* L. et le colorant synthétique elle est de 0.42mg/ml, 0.16mg/ml, et 0.39mg/ml respectivement.

L'étude de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque pour les différents extraits végétaux et de colorant synthétique montre un effet négative avec le colorants et l'extrait éthanolique des deux plantes, tandis que l'extrait méthanolique a montré un effet positif avec les quatre espèces *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spizizenii*, et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibitions maxima les remarquables pour chaque extrait méthanolique contre ces souches respectivement, (***Punica granatum* L.: 7,5 mm ; 7mm ; 10mm ; 11 mm**) ; (***Carthamus tinctorius* L.: 14 mm; 22mm ; 23mm ; 24mm**).

**Mots clés :** *Carthamus tinctorius* L., *Punica granatum* L. colorants azoïques, teneur en phénols, screening phytochimique, activité antioxydant, DPPH, activité antibactérienne.

## Abstract

This work was carried out as part of a comparative study of the antibacterial and antioxidant activity of two medicinal plants used as natural dyes (*Punica granatum* L. and *Carthamus tinctorius* L.) with a synthetic azo dye, as well as a phytochemical study using the two previous plants.

The phytochemical tests of different extracts carried out during this study revealed the presence of different families of chemical compounds of secondary metabolites existing at varying levels.

The methanolic, ethanolic, and aqueous yield of plants studied for *Punica granatum* L. and *Carthamus tinctorius* L. is (49%, 24%, 42% for *Punica granatum* L.) and (37%, 86%, and 25% for *Carthamus tinctorius* L.) respectively.

The total polyphenol test shows that the total phenol content is (**1,178 ± 3,77 mg EAG/g** et de **0,432 ± 0,23 mg EAG/g**) for *Punica granatum* L. and (**1,906 ± 18,85 mg EAG/g, et 0,082 ± 0,40 mg EAG/g**) for *Carthamus tinctorius* L. in methanolic and ethanolic extracts.

Antioxidant activity was achieved by DPPH method, the inhibitory concentrations in 50% (IC<sub>50</sub>), was recorded at 15 min for *Punica granatum* L, *Crathamus tinctorius* L. and synthetic azo dye which are **0.42mg/ml, 0.16mg/ml, and 0.39mg/ml** respectively.

The study of the antibacterial activity by the disc diffusion method for different plant extracts and synthetic dye showed a negative effect with dye and ethanolic extract of both plants, while methanolic extracts showed a positive effect with all species, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spizizenii*, et *Staphylococcus aureus*. With remarkable maximum inhibition zone for each methanolic extract against these strains respectively (***Punica granatum* L. : 7, 5mm; 7mm; 10mm; 11 mm**); (***Crathamus tinctorius* L.: 14 mm; 22mm; 23mm; 24mm**).

**Key words:** *Punica granatum* L, *Carthamus tinctorius* L., Azo dyes, phenol content, phytochemical screening, antioxidant activity, DPPH, Antibacterial activity.

## الملخص

تم إجراء هذا العمل في إطار دراسة مقارنة للنشاط البكتيري والنشاط المضاد للأكسدة لاثنين من النباتات الطبية المستخدمة كملونات طبيعية (الرمان والعصفر) مع ملون اصطناعي (1-(3,4-chlorophenylazo)-2-naphthol). بالإضافة إلى إجراء دراسة كيميائية نباتية باستخدام النباتين السابقين.

كشفت دراسة الاختبارات الكيميائية النباتية للمستخلصات المختلفة التي أجريت خلال هذه الدراسة عن وجود عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية للأيضات الثانوية الموجودة بمستويات متفاوتة.

بعد عملية النقع في مختلف المحاليل (الإيثانول، الميثانول، الماء) وعملية التبخير لكل من الرمان والعصفر تم الحصول على مردود قدره (الرمان: 24%-49%-42%العصفر: 25%-37%-86%) على التوالي .

وفيما يتعلق بإجمالي محتوى البوليفينول فقد تم تحديده بـ  $1,178 \pm 3,77 \text{ mg EAG/g}$  والعصفر باستخدام مستخلص الميثانول والإيثانول على التوالي.  $0,432 \pm 0,23 \text{ mg EAG/g}$  بالنسبة للرمان و  $1,906 \pm 18,85 \text{ mg EAG/g}$ ،  $0,82 \pm 0,40 \text{ mg EAG/g}$  بالنسبة للعصفر باستخدام مستخلص الميثانول والإيثانول على التوالي.

تم تحقيق نشاط مضاد الأكسدة باستخدام DPPH. وقد تم تسجيل التركيز المثبط IC 50 في الدقيقة 15 بالنسبة للرمان، العصفر، والملون الاصطناعي حيث قدر بـ ( $0,42 \text{ mg/ml}$ ،  $0,16 \text{ mg/ml}$ ،  $0,39 \text{ mg/ml}$  على التوالي).

أظهرت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا عن طريق عملية الانتشار بواسطة القرص للمستخلصات النباتية و الصبغ الاصطناعي تأثيرا سلبيا مع الصبغ ومستخلص الإيثانول لكلا النباتين في حين أظهر مستخلص الميثانول تأثيرا إيجابيا مع الأنواع الأربعة: *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus spizizenii*، *Staphylococcus aureus*، الحد الأقصى لمنطقة تثبيط البكتيريا لكل مستخلص ضد هذه السلالات ممثلة هي (الرمان: 7,5 ملم-7ملم-11ملم-10ملم -العصفر: 14ملم-22ملم-23ملم-21ملم) على التوالي

**الكلمات المفتاحية:** الرمان، العصفر، صبغة أزوتية، الاختبارات الكيميائية، محتوى الفينول، مضادات الأكسدة، DPPH، مضاد البكتيريا.

*Table des matières*

|  |    |
|--|----|
| Résumé : .....   | 6  |
| Abstract .....   | 7  |
| المخلص .....   | 1  |
| <i>Table des matières</i> .....  | 1  |
| <i>Liste des abréviations</i> .....  | 1  |
| <i>Liste des figures</i> .....   | 1  |
| <i>Liste des tableaux</i> .....  | 1  |
| <i>Partie 1 Etude bibliographique</i> .....  | 3  |
| <i>Chapitre I Présentation sur les espèces étudiées</i> .....                      | 4  |
| 1. <i>Carthamus tinctorius</i> L. ....   | 1  |
| 1.1. Historique : .....  | 1  |
| 1.2. Classification botanique de <i>Carthamus tinctorius</i> L. ....               | 1  |
| 1.3. Botanique du <i>Carthamus tinctorius</i> L : .....                            | 2  |
| 1.3.1. La graine (Fruit) : .....   | 2  |
| 1.4. Les constituants chimiques présents dans <i>Carthamus tinctorius</i> L. ....  | 4  |
| 1.5. Distribution et production dans le monde : .....                              | 5  |
| 1.6. Utilisations traditionnelles et folkloriques : .....                          | 6  |
| 1.7. Application Pharmacologique : .....   | 6  |
| 2. <i>Punica granatum</i> L. ....  | 8  |
| 2.1. Historique : .....  | 8  |
| 2.2. Nomenclature : (Ilham HMID., 2013; Alhijna Odai Saleh Ali et al., 2017) ..... | 9  |
| 2.3. Classification botanique : .....  | 9  |
| 2.4. Description botanique : .....   | 10 |
| 2.4.1. Les Fleurs : .....  | 10 |
| 2.4.2. Les Feuilles .....  | 11 |

|   |    |
|---|----|
| 2.4.3. Les Fruits : .....   | 12 |
| 2.5. Composition phytochimique du fruit, feuille, fleur, racine et écorce du grenadier..... | 13 |
| 2.6. Répartition géographique du grenadier : .....  | 14 |
| 2.7. Utilisation traditionnelle du <i>Punica granatum</i> L :.....                          | 15 |
| <i>Chapitre II Les éléments actifs d'une plante médicinale</i> .....                        | 18 |
| 1. Les métabolites primaires : .....  | 17 |
| 1.1. Les glucides : .....   | 17 |
| 1.2. Les acides aminés :.....   | 17 |
| 1.3. Les lipides :.....   | 18 |
| 1.3.1. Les type des lipides :.....  | 18 |
| A. Les lipides simples : .....  | 18 |
| A.1. Les acides gras saturés :.....   | 18 |
| A.2. Les acides gras insaturés :.....   | 18 |
| B. Les lipides à plusieurs fonctions :.....   | 18 |
| 1.3.2. Classification : .....   | 18 |
| 2. Les métabolites secondaires : .....  | 19 |
| 2.1. Les composés phénoliques : .....   | 20 |
| 2.1.1. Tanins :.....  | 20 |
| A. Tanins hydrolysables :.....  | 21 |
| B. Tanins condensés :.....  | 21 |
| 2.1.2. Flavonoïde : .....   | 22 |
| 2.1.3. Acide phénolique : .....   | 22 |
| A. Acide hydroxybenzoïques : .....  | 23 |
| B. Acide hydroxycinnamiques :.....  | 23 |
| 2.1.4. Anthocyane : .....   | 23 |
| 2.1.5. Coumarine :.....   | 24 |
| 2.2. Les alcaloïdes : .....   | 24 |

|   |    |
|---|----|
| <i>Chapitre III Les activités biologiques et les colorants azoïques</i> ..... | 26 |
| 1. Activité Antioxydant :.....  | 26 |
| 1.1. Introduction : .....   | 26 |
| 1.2. Définition des Radicaux libres : .....                                   | 26 |
| 1.3. Evaluation de l'activité antioxydante : .....                            | 27 |
| 1.4. Stress oxydant :.....  | 28 |
| 1.5. Antioxydants :.....  | 28 |
| 1.5.1. Définition :.....  | 28 |
| 1.5.2. Classification des antioxydants :.....                                 | 29 |
| A. Antioxydants endogènes : .....   | 29 |
| B. Antioxydant enzymatique oncogène : .....                                   | 29 |
| 2. Activité antibactérienne : .....   | 29 |
| 2.1. Définition de l'activité antibactérienne : .....                         | 30 |
| 2.2. Les principales substances antibactériennes :.....                       | 30 |
| 2.2.1. Les bactéries : .....  | 30 |
| 2.2.2. Les antibiotiques : .....  | 30 |
| 2.3. Micro-organismes utilisés : .....  | 31 |
| 2.3.1. Bactéries à gram négatif : .....                                       | 31 |
| A. Genre <i>Pseudomonas</i> :.....  | 31 |
| B. Genre <i>Escherichia</i> : .....   | 31 |
| 2.3.2. Bactéries à gram positif : .....                                       | 31 |
| A. Les <i>Streptocoques</i> : .....   | 31 |
| 3. Les colorants azoïques : .....   | 32 |
| 3.1. Les types des colorants azoïques :.....                                  | 32 |
| <i>Partie 2 Etude expérimentales</i> .....                                    | 33 |
| <i>Chapitre I Matériels et méthodes</i> .....                                 | 34 |
| 1. Matériel et méthode.....   | 33 |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.1. Matériel végétal .....   | 33        |
| 1.2. Méthodes : .....   | 34        |
| 1.2.1. Préparation de matériel végétal : .....  | 34        |
| 1.2.2. Analyse qualitative : .....  | 34        |
| 1.2.2.1. Screening phytochimique : .....  | 35        |
| A. Préparation des extraits végétaux : .....  | 35        |
| B. Identification des groupes chimiques : .....   | 40        |
| 1.2.2.2. Identification des métabolites primaires : .....                                   | 42        |
| 1.2.3. Analyse quantitative : .....   | 42        |
| 1.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux : .....  | 42        |
| 1.2.3.2. Activités biologiques : .....  | 44        |
| 1.2.3.2.1. Etude de l'activité anti-oxydante : .....  | 44        |
| 1.2.3.2.2. Etude de l'activité anti bactérienne : .....                                     | 50        |
| <b>Chapitre II Résultats et discussions</b> .....   | <b>53</b> |
| 1. Analyse qualitative (Screening phytochimique) : .....                                    | 53        |
| 2. Rendement en extraits bruts : .....  | 55        |
| 3. Analyse quantitative : .....   | 57        |
| 3.1. Dosage des polyphénols totaux : .....  | 57        |
| 4. Activités biologiques : .....  | 59        |
| 4.1. L'activité antioxydante : .....  | 59        |
| 4.2. L'activité antibactérienne : .....   | 61        |
| 4.2.1. Résultat : .....   | 61        |
| 4.2.1.1. Extrait méthanolique : .....   | 61        |
| 4.2.1.2. Extrait éthanolique : .....  | 62        |
| 4.2.1.3. Résultats de l'activité antibactérienne de colorant synthétique (azoïques) : ..... | 62        |
| 4.2.2. Evaluation de l'activité antibacterienne : .....                                     | 63        |
| 4.2.2.1. Les colorants naturels : .....   | 63        |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.2.2. Colorantsynthétique (1-(3,4-chlorophenylazo)-2- naphтол) : .....  | 67 |
| 4.2.3. Comparaison de l'effet antibactérien entre l'extrait des plantes utilisé comme<br>colorants naturels et le colorant synthétique de même couleur : ..... | 67 |
| Conclusion et perspectives .....   | 70 |
| Références bibliographiques : .....  | 73 |
| <b>Annexes</b> .....   | 89 |

*Liste des abréviations*

**AAO** : Activité antioxydant

**Abs** : Absorbance

**(AH) n** : Un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH

**ASC** : Acide ascorbique

**°C** : Degré Celsius

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>**: Unité isoprénique

**C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-N=N-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>**: Azobenzène

**C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>** : Acetate d'l's-l'-acetoxychavicol

**CuSO<sub>4</sub>**: Sulfate de cuivre

**DHHDP** : Déhydrohexahydroxydiphénique

**EAG/g.MS** : Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche

**EX.AQ** : Extrait aqueux.

**EOR** : espèces oxygénées réactives

**EX.Méth** : Extrait méthanolique

**FeCL<sub>3</sub>** : Chlorure ferrique

**FCR** : Folin-Ciocalteu

**HE** : Huile essentielle

**HCl** : Acide chlorhydrique

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** :D'acide phosphomolybdique

**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** :D'acide phosphotungstique

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Acide sulfurique

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%

**KOH** : Hydroxyde de potassium

**Me**: Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant

**M<sub>v</sub>**: Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**: Carbonate de sodium

**NH<sub>4</sub>OH**: Ammoniaque

**Nm** : Nanomètre

**NO** : Monoxyde d'azote

**OH** : Fonction hydroxyle

**OH<sup>·</sup>** : radical hydroxyle

**ONOOH** : Nitroperoxyde

**PH** : Potentiel d'hydrogène

**PM** : Poids moléculaire

**R%** : Rendement en %

**RO<sup>·</sup>** : Radical alkoxyde

**ROO<sup>·</sup>** : Radical peroxyde

**ROS**: Reactive Oxygen Species

**SM** : Spectrométrie de masse

**SOD**: Syperoxyde dismutase

Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 01</b> : Plante entière du <i>carthamus tinctorius</i> L.....  | 2  |
| <b>Figure 02</b> : Graine du <i>Carthamus tinctorius</i> L.....  | 3  |
| <b>Figure 03</b> : Fleure du <i>Carthamus tinctorius</i> L. ....   | 3  |
| <b>Figure 04</b> : Feuille du <i>Carthamus tinctorius</i> L.....   | 4  |
| <b>Figure 05</b> : Les différents constituants chimiques présents dans les feuilles séchées de <i>Carthamus tinctorius</i> L. .... | 4  |
| <b>Figure 06</b> : Fleurs et fruits du Grenadier ( <i>Punica granatum</i> L.).....   | 10 |
| <b>Figure 07</b> : Fleurs aux sépales charnus et rouges et aux pétales froissés .....  | 11 |
| <b>Figure 08</b> : Feuilles lancéolées de <i>Punica granatum</i> L.....  | 12 |
| <b>Figure 09</b> : La grenade et ses différentes parties.....  | 12 |
| <b>Figure 10</b> : Répartition géographique du grenadier. ....   | 14 |
| <b>Figure 11</b> : Utilisation traditionnelle du <i>Punica granatum</i> L. ....  | 17 |
| <b>Figure 12</b> : Les métabolites primaires.....  | 17 |
| <b>Figure 13</b> : Classification les lipides.....   | 19 |
| <b>Figure 14</b> : Les métabolismes secondaires.....   | 20 |
| <b>Figure 15</b> : Structure de base des tannins hydrolysable .....  | 21 |
| <b>Figure 16</b> : structure chimique du tanin condensé.....   | 21 |
| <b>Figure 17</b> : Squelette de base des flavonoïdes .....   | 22 |
| <b>Figure 18</b> : Squelette de base des coumarines .....  | 24 |
| <b>Figure 19</b> : Structure d'alcaloïdes .....  | 25 |
| <b>Figure 20</b> : La formule des radicaux libre.....  | 26 |
| <b>Figure 21</b> : Neutralisation d'une radicale libre par un antioxydant .....  | 27 |
| <b>Figure 22</b> : stress oxydant .....  | 28 |
| <b>Figure 23</b> : Le <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sous le microscope électronique.....   | 31 |
| <b>Figure 24</b> : Structure chimiques des colorants azoïques.....   | 32 |
| <b>Figure 25</b> : Ecorce du fruit de la grenade sèche .....   | 33 |
| <b>Figure 26</b> : <i>Carthamus tinctorius</i> L.....  | 34 |
| <b>Figure 27</b> : Préparation du matériel végétal (broyage et tamisage) .....   | 34 |
| <b>Figure 28</b> : Etapes de la macération éthanolique de la grenade ( <i>Punica granatum</i> L.).....                             | 36 |
| <b>Figure 29</b> : Etapes de la macération éthanolique de la <i>Crathamus tinctorius</i> L. ....                                   | 37 |
| <b>Figure 30</b> : Différentes étapes de préparation de l'extrait aqueuse de la grenade.....                                       | 38 |
| <b>Figure 31</b> : Différentes étapes de préparation de l'extrait méthanolique de le <i>Carthamus tinctorius</i> L. ....           | 39 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 32</b> : Matériel de dosage des polyphénols totaux et de l'acide gallique .....  | 43 |
| <b>Figure 33</b> : Protocole de dosage des polyphénols totaux .....  | 44 |
| <b>Figure 34</b> : Equation du radical DPPH transformé en DPPH .....   | 45 |
| <b>Figure 35</b> : Préparation de la solution DPPH .....   | 45 |
| <b>Figure 36</b> : Préparation de l'extrait ( <i>Punica granatum</i> L. et le <i>carthamus tinctorius</i> L.).....   | 47 |
| <b>Figure 37</b> : Préparation de colorant 1-(3,4-chlorophenylazo)-2- naphтол. ....  | 49 |
| <b>Figure 38</b> : Protocole d'évaluation de l'activité anti-oxydante.....   | 49 |
| <b>Figure 39</b> : Rendement des extraits bruts.....   | 56 |
| <b>Figure 40</b> : Teneurs des polyphénols totaux des extraits. ....   | 58 |
| <b>Figure 41</b> : IC <sub>50</sub> des différents extraits. ....  | 60 |
| <b>Figure 42</b> : Effet de l'extrait méthanolique de <i>Punica granatum</i> L. sur les bactéries étudiées. ..   | 63 |
| <b>Figure 43</b> : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de <i>Punica granatum</i> L. sur les différentes<br>souches dans différentes concentrations. ....     | 64 |
| <b>Figure 44</b> : Effet de l'extrait méthanolique de <i>Carthamus tinctorius</i> L. sur les bactéries étudiées.<br>.....                                      | 65 |
| <b>Figure 45</b> : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de <i>Carthamustinctorius</i> L. sur les différentes<br>souches dans différentes concentrations. .... | 66 |
| <b>Figure 46</b> : Effet de colorant synthétique sur les bactéries étudiées. ....  | 67 |

*Liste des tableaux*

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 01</b> : Classification botanique de <i>Carthamus thinctorius</i> L. ....   | 1  |
| <b>Tableau 02</b> : Production en tonnes des graines de carthame. Chiffres <b>2004-2005</b> .....                                      | 5  |
| <b>Tableau 03</b> : L'importance pharmaceutique des métabolites/ extrait de carthame.....  | 6  |
| <b>Tableau 04</b> : Quelques composés phytochimiques de <i>Punica granatum</i> L. ....   | 13 |
| <b>Tableau 05</b> : Utilisation des différents du grenadier en médecine traditionnelle .....   | 16 |
| <b>Tableau 06</b> : Exemples de dérivés de l'acide benzoïque identifiés chez des plantes halophytes                                    | 23 |
| <b>Tableau 07</b> : Exemples de dérivés de l'acide hydroxycinnamique rencontrés chez des plantes<br>halophytes.....                    | 23 |
| <b>Tableau 08</b> : Principaux radicaux libres et leur structure chimique .....  | 27 |
| <b>Tableau 09</b> : Les différentes concentrations des extraits.....   | 46 |
| <b>Tableau 10</b> : Nomenclature, formule et structure chimique de colorants synthétiques.....   | 48 |
| <b>Tableau 11</b> : Liste des souches bactériennes étudiées. ....  | 50 |
| <b>Tableau 12</b> : Évaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition.....  | 52 |
| <b>Tableau 13</b> : Résultats d'analyse phytochimique des métabolites primaires et secondaires. ....                                   | 54 |
| <b>Tableau 14</b> : IC <sub>50</sub> et inhibitions maximales des extraits déterminés par la méthode de DPPH. ..                       | 59 |
| <b>Tableau 15</b> : Activité antibactérienne des différentes extractions méthanoliques contre les<br>souches bactériennes testées..... | 61 |
| <b>Tableau 16</b> : Résultats de l'activité antibactérienne d'extrait de colorant. ....  | 62 |

# *Introduction générale.*





Si la phytothérapie connaît un engouement inhabituel à travers le monde entier, Il est impossible de la considérer comme un simple phénomène de mode. Bien sûr, notre époque est profondément marquée par la recherche d'une vie plus saine, d'un retour à la nature et aux valeurs essentielles. Mais le succès de la phytothérapie s'explique avant tout par le niveau de maîtrise technique et scientifique atteint dans ce domaine. L'agronomie, la chimie et la pharmacologie ont permis de développer des formes thérapeutiques. Et des formes galéniques plus sûre plus adaptées et plus efficaces. Par son action douce et profonde, la phytothérapie apparaît comme la réponse idéale aux "maladies du siècle" qui caractérisent nos sociétés, telles que le stress, la perte de sommeil ou la prise de poids (**Michtl et Anton, 2003**).

Un médicament d'origine végétale est un " complexe " de molécules, issues d'une ou plusieurs espèces végétales. De nombreuses formes galéniques sont aujourd'hui disponibles, certaines plus innovantes que d'autres, laissant la perfusion d'origine plus ou moins obsolète. (**Michtl et Anton, 2003**).

Les plantes médicinales sont capables de synthétiser des molécules chimiques appelées métabolites pouvant être utiles pour l'industrie pharmaceutique (**Hassan, 2012**) ou pour la synthèse chimique. Il existe deux types de métabolites : primaires et secondaire. Pour assurer sa croissance et son développement, la plante stabilise les métabolites primaires tout en améliorant la survie, par ses mécanismes de défense, assure sa reproduction, et produit des métabolites secondaires. (**Daley, 2017**).

Parmi ces plantes, il y a la *Punica granatum* L. et le *Carthamus tinctorius* L. Ils sont connus depuis des millénaires, elles sont utilisées à la fois comme épices, source des colorants naturels et comme plantes médicinales. La *Punica granatum* L. est originaire du Moyen-Orient utilisée principalement comme médicaments pour l'estomac, l'infertilité masculine, l'arthrite, et l'obésité et Alzheimer (**Lansky et Newman, 2007 ; Padma, 2015**).Le *Carthamus tinctorius* L. est originaire d'Asie du sud, utilisés pour la coloration cosmétique, notamment pour le visage et les cheveux, les champoings et les lotions pour le corps (**mani et al., 2020**). Les composés actifs de ces deux plantes peuvent avoir des propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes, antioxydante, et antivirales. (**Shukla et al, 2008 ; Braga et al, 2005 ; Kotwal, 2008 ; Guo et al., 2019 ; Khalid et al., 2017**).

Dans le cadre de notre recherche nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et évaluation biologique de deux plantes médicinales et un colorant synthétique, la *Punica*

*granatum* L. « le grenadier » de la famille des *Punicacées*. Le *Carthamus tinctorius* L. de la famille des *Asteraceae* et le 1-(3,4-chlorophenylazo)-2-naphtol de la famille des colorants azoïques.

Ce travail est divisé en deux parties principales, dans la première, nous présentons une synthèse bibliographique composée de trois chapitres ;

- ✓ .....C
- ✓ Chapitre 1 : Présentation sur les espèces étudiées (*Punica granatum* L. et *Carthamus tinctorius* L.)
- ✓ Chapitre 2 : Métabolisme des plantes médicinales
- ✓ Chapitre 3 : Les activités biologiques et les colorants azoïques

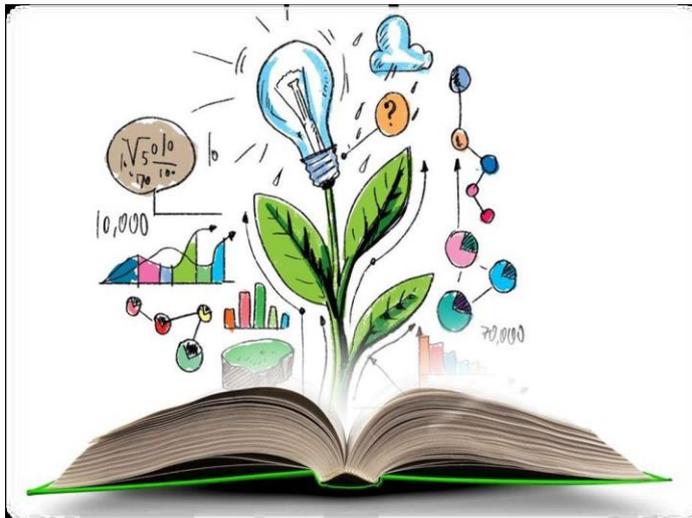
La seconde partie est la partie expérimentale, elle s'articule autour :

- ✓ Le matériel et les différentes méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail.
- ✓ Le screening phytochimique.
- ✓ L'étude de l'activité antioxydant et antibactérienne des extraits des deux espèces et le colorant synthétique qui est 1-(3,4-chlorophenylazo)-2-naphtol.
- ✓ La présentation et la discussion des résultats obtenus au cours de ce travail.

Enfin, nous terminons par une conclusion générale suivie des références bibliographiques trouvées à la fin du manuscrit.

# *Partie 1*

## *Etude bibliographique*





## *Chapitre I*

# *Présentation sur les espèces étudiées*



## 1. *Carthamus tinctorius* L.

### 1.1. Historique :

C'est une espèce euro-méditerranéenne, d'origine orientale. Carthame Teinture autrefois utilisée pour teindre la soie et le coton (**Baba Issa, 1999**). Les fleurs sont utilisées comme colorant alimentaire, notamment en Espagne à l'Est Amérique de l'Est et du Sud. Selon François (2009), au XVIIe siècle en Angleterre la plante est utilisée pour teindre les tissus en jaune ou en rouge. Au 19ème siècle, la phytothérapie nord-américaine utilisait le carthame pour stimuler la plante Transpiration, favorisant l'apparition des menstruations et traitant la rougeole (**Chevllier, 2001**).

En Chine, les fleurs de carthame sont utilisées pour soigner et apaiser (**Baba Issa, 1999**). En Europe, sa culture est limitée aux régions du sud et du centre où on le trouve Parfois dans un état semi-spontané. En Algérie, selon Baba Issa (1999), le carthame est une espèce cultivée et rarement Spontané dans la colline. Les espèces cultivées étaient utilisées en maquillage. Selon El- Al-Ghassani était également cultivé à Fès pour le même usage. Comme l'a souligné Ibn al-Bitar : Deux espèces : l'une est sauvage (*C. lanatus* L.) et l'autre est cultivée (*C. tinctorius* L.) appelée.

Sous le nom de Kattam. Les fleurs de carthame sont souvent utilisées pour falsifier la poudre de safran qui est très chère Élevé (**Baba Issa, 1999**). D'où le nom Safran Rascal (**Delaveau et al., 1985**).

### 1.2. Classification botanique de *Carthamus tinctorius* L.

Selon (**Spichiger et al., 2004**), le carthame est classé comme suit :

**Tableau 01** : Classification botanique de *Carthamus thinctorius* L.

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| <b>Règne</b>           | <b>plante</b> |
| <b>Embranchement</b>   | Magnomiphyta  |
| <b>Sous-embranchem</b> | Angiospermes  |
| <b>Classe</b>          | Dicotylédones |
| <b>Ordre</b>           | Astérales     |
| <b>Famille</b>         | Astéracée     |
| <b>Sous –famille</b>   | Carduoidées   |

### 1.3. Botanique du *Carthamus tinctorius* L :

En ce qui concerne les caractéristiques morphologiques, le carthame est décrit comme une plante buissonnante, herbacée, annuelle ou hivernale, avec des tiges verticales et cylindriques et des feuilles alternes, ovales, sur lesquelles il peut y avoir des épines (**Zhou, Tang, et al., 2014**). En conséquence, deux variétés sont distinguées en fonction de la présence ou de l'absence d'épines, à savoir les épineux et les sans épines. Il a été démontré que cette caractéristique botanique influence la quantité d'huile contenue (**Guatam, et al 2014**). L'ensemble des branches de la plante (c'est-à-dire les types primaire, secondaire et tertiaire) se terminent par des capitules tubulaires appelés capitules (**Emongor., 2010**). Ces fleurs de couleur jaune vif, orange ou rouge sont entourées de bractées épineuses (**singh et al., 2006**). Elle possède de nombreuses racines latérales horizontales fines ainsi qu'une racine pivotante, qui peut se développer à des profondeurs de plus de deux mètres pour utiliser les nutriments et les réserves d'eau souterraine dans les climats arides. Néanmoins, cette espèce végétale est cultivée en serre ou en culture pluviale (**Emongor., 2010**).



**Figure 01** : Plante entière du *carthamus tinctorius* L. (**deut shland flora in abbidungen, 1796**)

#### 1.3.1. La graine (Fruit) :

Les fruits sont souvent des graines semi-transparentes, quadrangulaires (**5.5 à 8mm ; 3 à 5mm**), blanc pur, dans la partie supérieure cette couleur vire au marron claire. Les parties internes de la tête portent souvent des fibres capillaires d'environ **6mm** de long. Les graines de carthame sont présentes dans une coquille épaisse. Cependant, comme dans la taille des graines de tournesol et de carthame varie selon les cultivars et les conditions de croissance, mais ils ont

forme de petites graines de tournesol. La longueur moyenne (6-7 mm) est d'environ 25000 graines/kg. (Belaid., 2017).



Figure 02 : Graine du *Carthamus tinctorius* L. (yesilyurt et al., 2020).

### 1-3-2 Les Fleurs :

Ils sont tubulaires, filamenteux jaune rougeâtre à orange jaunâtre (Bezenger, 1990), regroupées en capitules à bractées épineuses (Hans, 2007), Il a un diamètre de 2 à 4 cm, est assemblé dans des moules légers portant. La base est un large bandage de bractées vertes (mioulane, 2008).



Figure 03 : Fleure du *Carthamus tinctorius* L. (Zhou et al., 2013).

### 1-3-3 Les Feuilles :

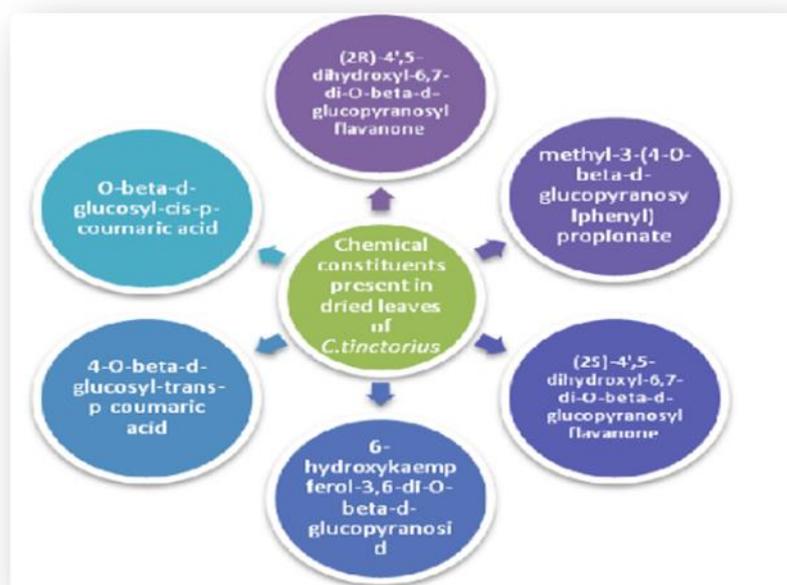
Elles sont de couleur verte, de 3 à 9 cm de long. Ils sont alternes, brillants, en forme de dent avec un bord ondulé et portant des dents barbelé (Patrick, 2004 ; Fournier, 1947 ; Deboin et al, 2009).



**Figure 04 :** Feuille du *Carthamus tinctorius* L. (Bouزيد et al., 2019).

#### 1.4. Les constituants chimiques présents dans *Carthamus tinctorius* L.

Plus de 200 composés ont été isolés de *Carthamus tinctorius* L et les plus connus sont les flavonoïdes, les phénylétanoïdes glycosides, coumarines, acide gras, stéroïdes et polysaccharides. (Zhou et al., 2009). D'importants des composés chimiques présents dans le carthame sont présentés dans la figure (5). La teneur en huile des graines est similaire à celle de l'olive et comprend de l'acide linoléique (63%-72%), l'acide oléique (16%-25%) et l'acide linoléique (1%-6%). (Kim, Chaj, et al., 2009) On a également trouvé de la lutéoline et ses glucopyranosides dans les feuilles.



**Figure 05 :** Les différents constituants chimiques présents dans les feuilles séchées de *Carthamus tinctorius* L.

**1.5. Distribution et production dans le monde :**

Le carthame a une longue histoire de culture depuis des centaines d’années, de la chine à la région méditerranéenne et tout au long de la vallée du Nil, jusqu’en (**Ethiopieueiss, 1971**). Commercialisés en Inde, aux États-Unis d’Amérique, aux Mexique, en Ethiopie, Kazakhstan, Australie, cultivent le carthame dans une mesure limitée. Historiquement, les surfaces et la production de carthame dans le monde ont connu de fortes fluctuations au cours des le passé.

La production des graines de carthame dans le monde est passé de **487.000 tonnes en 1965** à **1007000 tonnes en 1975**, elle a ensuite diminué pour atteindre **921000 tonnes en 1985** (**Anonyme, 2020**). Le Mexique était le plus important producteur de carthame au monde jusqu’en **1980**.

La production mondiale de graine de carthame était d’environ **627653 tonnes en 2018**.

Au cours de l’année **2018** cette production a diminué d’environ**17.7%** par rapport à l’année précédente. Etsi on la compare à la production d’il y a **10 ans** elle a diminué de **10.72%**(**Anonyme, 2020 a**).

Au cours de l’année **2019**, Kazakhstan a été le premier pays à produire des graines de carthame parmi 13 pays.

**Tableau 02 :** Production en tonnes des grainedes carthame. Chiffres **2004-2005** (base de données de la **FAO accès 2006**).

| Pays   | 2004              | %            | 2005              | %            | 2020           |
|--|-------------------|--------------|-------------------|--------------|----------------|
|  Mexique      | 212 765,00        | 33 %         | 212 765,00        | 26 %         | 86 793         |
|  Inde         | 129 000,00        | 20 %         | 210 000,00        | 26 %         | 44 000         |
|  États-Unis   | 79 730,00         | 12 %         | 87 340,00         | 11 %         | 67040          |
|  Kazakhstan   | 76 105,00         | 12 %         | 75 000,00         | 9 %          | 226 739        |
|  Australie    | 26 000,00         | 4 %          | 60 000,00         | 7 %          | 3602           |
|  Argentine    | 18 000,00         | 3 %          | 51 000,00         | 6 %          | 22565          |
|  Éthiopie     | 38 000,00         | 6 %          | 38 000,00         | 5 %          | 9349           |
|  Chine        | 30 000,00         | 5 %          | 32 000,00         | 4 %          | 33 404         |
|  Kirghizistan | 22 510,00         | 3 %          | 20 000,00         | 2 %          | 9870           |
|  Ouzbékistan  | 8 260,00          | 1 %          | 8 000,00          | 1 %          |                |
|  Tanzanie     | 5 000,00          | 1 %          | 5 000,00          | 1 %          |                |
|  Tadjikistan  | 2 919,00          | 0 %          | 3 000,00          | 0 %          |                |
|  Canada       | 2 000,00          | 0 %          | 2 000,00          | 0 %          |                |
|  Hongrie      | 650               | 0 %          | 650               | 0 %          |                |
|  Iran         | 500               | 0 %          | 500               | 0 %          |                |
|  Russie       | 180               | 0 %          | 200               | 0 %          | 96 636         |
|  Turquie      | 150               | 0 %          | 150               | 0 %          |                |
|  Espagne      | 17                | 0 %          | 17                | 0 %          |                |
| <b>Total</b>   | <b>651 791,00</b> | <b>100 %</b> | <b>805 627,00</b> | <b>100 %</b> | <b>653 030</b> |

### 1.6. Utilisations traditionnelles et folkloriques :

D'un point de vue historique, des graines et des sachets de carthame, ainsi que des guirlandes de fleurons, ont été largement retrouvés en présence de momies dans toute l'Égypte ancienne (Weiss, 1971) De plus, le carthame est consommé cru dans de larges régions de l'Iran.(Royan, 2012) La teinture dans la cuisine italienne, française et britannique comme arôme et comme colorant. Les fleurs étaient appliquées de manière variée comme teinture, colorant, arôme, rouge, potion et onguent. Les colorants de carthame étaient particulièrement importants pour les industries de tissage de tapis en Europe de l'Est, au Moyen-Orient et dans le sous-continent indien (Dajue, 1996). (Guarrera, 2006). En Thaïlande, l'extrait aqueux de fleurs de carthame a été largement utilisé comme promoteur de la couleur du cheveu (Boonyaprapas, 1996).

### 1.7. Application Pharmacologique :

L'ingrédient actif et principal du carthame est un pigment jaune soluble dans l'eau. "carthamidine", et ayant des valeurs médicinales pour traiter les maladies, les problèmes menstruels et les gonflements associés aux traumatismes.

Récemment, les pigments de carthamine ont été utilisés pour la coloration cosmétique, notamment pour le visage, les cheveux, les champoings et des lotions pour le corps (Mani et al, 2020)

Les jaunes d'hydroxysaffor A et B (HSYA et HSYB) extraits de fleurs provoquent une réponse inflammatoire variée, y compris la prolifération de l'ADN.

L'importance pharmaceutique des métabolites/ extrait de carthame répertoriés dans le tableau 03.

**Tableau 03 :** L'importance pharmaceutique des métabolites/ extrait de carthame.

| Activité biologique         | Carthame plante Parier | Composé actif          | Biologique/ modèle de laboratoire | Activité observée  | Référence        |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|--|------------------|
| Anti-inflammatoire efficace | Fleur                  | Hydroxysafflor jaune A | Humain                            | Il entraine l'activation des cellules musculaires lisses des branches bronchiques humaines et inhibe | Guo et al., 2019 |

|                            |       |                              |                 |   |                            |
|----------------------------|-------|------------------------------|-----------------|---|----------------------------|
|                            |       |                              |                 | également le facteur d'activation des plaquettes (PAF) qui conduit à la pro-inflammation                                      |                            |
|                            | Fleur | Carthamine jaune             | Rat             | Il conduit à une réduction complète de l'ischémie-reperfusion   | <b>Luo et al., 2015</b>    |
|                            | Fleur | Hydroxysafflor jaune B       | Rat             | Protection du cerveau contre l'ischémie cérébrale les lésions de reperfusion  | <b>Du et al., 2019</b>     |
| <b>Effet anticancéreux</b> | Fleur | Carthamine Polysaccharide    | Rat             | Elle inhibe les métastases et la prolifération des cellules du cancer du sein   | <b>Lou et al., 2015</b>    |
|                            | Fleur | Hydroxysafflor jaune B       | Humain          | Réduit la croissance des cellules cancéreuses   | <b>Qu et al., 2019</b>     |
|                            | Grain | Acide gras et acide phytique | Rat             | Activité anticancéreuse contre la lignée cellulaire HEPG2   | <b>Doha et al., 2019</b>   |
|                            | Grain | Extrait de grain             | <i>In vitro</i> | Effet inhibiteur du grain de carthame sur la prolifération de cellules cancéreuses humaines cellules cancéreuses colorectales | <b>Jeong et al., 2016.</b> |
| <b>Antioxydant</b>         | Grain | Grain de thé en granules     | Humain          | Activité Antioxydant et   | <b>Cho et al., 2011</b>    |

|                   |       |                    |          |  |                            |
|-------------------|-------|--------------------|----------|--|----------------------------|
|                   |       |                    |          | effets potentiels chez les femmes ménopausées  |                            |
|                   | Fleur | Carthame rouge     | Rat      | Antioxydant et protection contre L'hépatite pour diminuer l'induction des dommages au foie   | <b>Wu et al., 2013</b>     |
|                   | Grain | Sérotonine dérivés | In vitro | Forte activité de piégeage des radicaux et peroxydation lipidique  | <b>Khalid et al., 2017</b> |
| Anti-ostéoporosis | Grain | Huile de grain     | Rat      | Améliore l'ostéoporose   | <b>Alam et al., 2006</b>   |
|                   | Grain | Huile de grain     | Rat      | Les graines et les extraits de carthame stimulent la différenciation des ostéoblastes et favorisent un rétablissement rapide en cas de facteur | <b>Khalid et al., 2017</b> |

## 2. *Punica granatum* L.

### 2.1. Historique :

La grenade est l'un des plus anciens fruits comestibles, qui n'a pas beaucoup évolué, depuis la découverte de l'agriculture il y a plus de 1000 ans (**heber et al, 2006**).

Le nom du genre, *Punica*, a été l'appellation romaine de la ville de Carthage (banlieue nord de la Tunisie) où poussaient les meilleurs grenadiers. Le grenadier est cultivé depuis la plus haute Antiquité pour ses fruits comestibles (les grenades) et pour les qualités ornementales de ses grandes fleurs (**jurenka, 2008**).

Le grenadier et ses fruits ont été plantés dans les jardins de Babylone il y a 4000 ans. Une place importante dans la civilisation ancienne. En Égypte ; la grenade accompagne les morts

(abbayes et al., 1963), également cultivée dans de nombreux pays comme Amérique du Nord (stover et mercury. 2007). Originaire du moyen orient, il s'est propagé à travers la mer méditerranéenne, vers l'extrême orient en Chine et en Inde et dans le nouveau monde en Californie et Mexique (Lansky et Newman, 2007). Il a été cultivé sur tous les continents dans les régions tempérées chaud : comme les Proche-Orient et le sud-est des États-Unis, le Chili et l'Argentine. La ville de Grenade en Espagne doit son nom au grenadier (Ben Abd al-nabi, 2012).

Le plantations de la grenade a considérablement augmenté, surtout ces derniers jours, en raison de effets : Antioxydant, antibactérien anticancéreux et anti mutagène du fruit (Negi et al., 2003).

## 2.2. Nomenclature : (Ilham HMID., 2013; Alhijna Odai Saleh Ali et al., 2017)

- Nom scientifique : *Punicagranatum*L.
- Nom français : Arosse, Balaustier, Granatier, Grenadier, Migranier
- Nom anglais: pomegranate
- Nom espagnol: Granado, Mangrano
- Nom italien: Granata, Granato, Melograno, Me Pagrana
- Nom arabe : Romane
- En Angleterre :Carthaginian-apple, Dwarf Pomegranate, Pomegranat, Pomegranate.
- En Flamand : Granaatboom.
- Au Japon : Zakuro.
- Au Portugal :Granatbaum, Româ, Romanzeiro, Romazeira,.



## 2.3. Classification botanique :

La grenade « *Punica granatum* L. » vient du mot latin « *Malumgranatum* » qui signifie « Fruit à petit grain » (Cyr, 2017). Il été décrit par Linné et introduit pour la première fois dans son classement de 1753, révisé en 2003, par un groupe de botanistes, l'Angiosperm Phylogeny group ou APG, donnant lieu à une nouvelle classification phylogénétique (Wald, 2009).

Branchements : Angiospermes.

Sous branchement : Dicotylédones vraies

Classe : Rosidées.

Ordre : Myrtales.

Famille : Lythraceae.

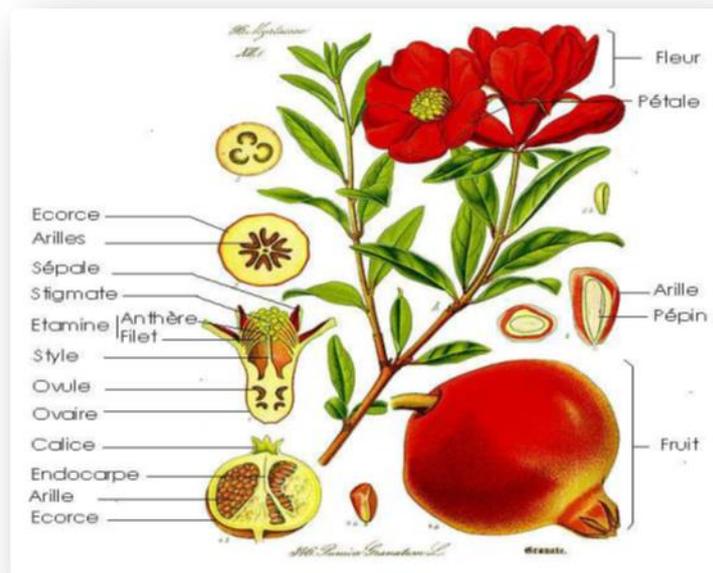
Genre : Punica.

Espèce : *Punicagranatum*L.



## 2.4. Description botanique :

Le Grenadier est un petit arbre à port arbustif qui peut atteindre 3 à 5 mètres de haut (storey, 2007). Recouvert d'une fine écorce grise, branches irrégulières en plus ou moins de branches épineux et grossier (pauk, 2001) porte des feuilles caduques et lancéolées en spires (pollard, 1997).



**Figure 06 :** Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum* L.) (Flora von Deutschland and Schweiz, 1885).

### 2.4.1. Les Fleurs :

Les fleurs des grenadiers, sont très ornementales de couleur rouge pourpre ou grenat. Elles émergent du calice, une sorte de « coquillage » cireuse, entre les mois de Mai et Août. Elles ont un aspect chiffonné et froissé (Ben Yahkem et al., 2018).

Le calice est formé de 4 à 8 sépales courts, charnus, épais, d'une belle couleur rouge vif, persistants, d'abord dressés puis étalés après la fécondation. De plus, la corolle comprend 4 à 8 pétales minces alternant avec les sépales. Ces pétales sont généralement très colorés, souvent rouge orangée vif, mais peuvent prendre de nombreuses autres teintes selon les variétés, comme le blanc, le jaune pâle, le blanc et le jaune foncé. Ils ont un aspect froissé. Ainsi, le gynécée est constitué de 8 ou 9 carpelles soudés au tube calice, disposés en deux verticilles. L'ovaire est inférieur et est surmonté d'un style conique terminé par une tête stigmatique. Enfin, les étamines, libres et très nombreuses, tapissent la paroi interne du réceptacle floral, à partir de la corolle (Garnier et al., 1961 ; Courchet, 1897).



**Figure 07 :** Fleurs aux sépales charnus et rouges et aux pétales froissés (Wald, 2009)

#### **2.4.2. Les Feuilles**

Les nouvelles feuilles du grenadier naissent assez tard, vers la fin Avril, sur des rameaux à l'écorce beige argenté. Sont oblongues, brillantes, étroites, entières et non stipulées, de 3 à 7 centimètres de long, et 2 cm de large selon les cultivars. Les feuilles sont de couleur rougeâtre au stade juvénile. Elles deviennent verdâtres et lumineuses à la maturité pour finir dorées à l'automne. La plupart des variétés de grenadiers ont des feuilles en paires traversant alternativement à angle droit, tandis que certaines variétés peuvent avoir trois feuilles par noeud et même quatre feuilles par noeud (deux feuilles opposées par noeud) (Ben Yahkem, Hadjadj, Others., 2018).



**Figure 08** : Feuilles lancéolées de *Punica granatum* L. (Wald, 2009)

### 2.4.3. Les Fruits :

La grenade, fruit du grenadier, est en forme de pomme passent avec le temps du vert au rouge-orange, doit être considérée comme un cas limite de baie délimitée par la peau, un péricarpe épais, à l'intérieur duquel de nombreux arilles. Chacun d'eux est constitué d'une graine (ou pépin) entourée d'un jus translucide contenu par une membrane très fine. Les arilles sont rencontrés dans des loges séparées par de fines membranes qui se prolongent à l'intérieur du fruit, ce qui donne au péricarpe une base pour l'attachement des arilles (Dallas, 2010)

Le Fruit donne ainsi naissance à trois parties distinctes les graines (environ 3% du poids du fruit) qui contiennent 20% d'huile, le jus (environ 30% du poids du fruit) et la peau, qui comprend également les membranes internes. (Lansky et Newman., 2007)



**Figure 09** : La grenade et ses différentes parties (Calin Sanchez et al., 2005).

## 2.5. Composition phytochimique du fruit, feuille, fleur, racine et écorce du grenadier

**Tableau 04 :** Quelques composés phytochimiques de *Punica granatum L.* (Lansky et al., 2005 ; Lansky et Newman, 2007).

| Nom du composé  | Classe chimique                  | Localisation dans la plante    |
|---|----------------------------------|--------------------------------|
| Acide citrique  | Acide organique                  | Pulpe (jus)                    |
| Acide malique   | Acide organique                  | Pulpe (jus)                    |
| Acide tartrique   | Acide organique                  | Pulpe (jus)                    |
| Acide gallique  | Acide hydroxbenzoïque            | Pulpe, écorce, fleur           |
| Acide caféique  | Acide hydroxbenzoïque            | Pulpe, écorce                  |
| Acide quinique  | Acide cyclitol carboxylique      | Pulpe, écorce                  |
| Acide <i>p</i> -coumarique  | Acide hydroxycoumarique          | Pulpe, écorce                  |
| Catéchine   | Flavan-3-ols                     | Pulpe, écorce                  |
| Epicatechiné  | Flavan-3-ols                     | Pulpe, écorce                  |
| Quercétine  | Flavonol                         | Pulpe, écorce                  |
| Kaempferol  | Flavonol                         | Écorce                         |
| Rutine  | Flavonol                         | Pulpe, écorce                  |
| Luteoline   | Flavone                          | Ecorce                         |
| Apigénine   | Flavone                          | Feuille                        |
| Naringine   | Flavanone                        | Ecorce                         |
| Delphinidine  | Anthocyanidine                   | Ecorce                         |
| Cyanidine   | Anthocyanidine                   | Ecorce                         |
| Pelargonidine   | Anthocyanidine                   | Ecorce                         |
| Cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside<br>Cyanidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside         | Anthocyanine                     | Pulpe                          |
| Delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside<br>Delphinidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside   | Anthocyanine                     | Pulpe                          |
| Pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside<br>Pelargonidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside | Anthocyanine                     | Pulpe                          |
| Acide éllagique   | Ellagitannin                     | Pulpe, écorce, Feuille         |
| Punicalagin   | Ellagitannin                     | Écorce, Feuille, tronc, racine |
| Punicalin   | Ellagitannin                     | Écorce, Feuille, tronc, racine |
| Acide punicoïque  | Acide gras insaturé conjugué     | Pépin                          |
| Acide linoléique  | Acide gras insaturé non-conjugué | Pépin                          |
| Acide oléique   | Acide gras insaturé non-conjugué | Pépin                          |
| Acide palmitique  | Acide gras saturé                | Pépin                          |

| Acide stéarique         | Acide gras saturé | Pépin         |
|-------------------------|-------------------|---------------|
| Cholestérol             | Stérol            | Pépin         |
| Campestérol             | Stérol            | Pépin         |
| Stigmastérol            | Stérol            | Pépin         |
| $\beta$ -sitostérol     | Stérol            | Pépin         |
| 17- $\alpha$ -estradiol | Stéroïde sexuel   | Pépin         |
| Estriol                 | Stéroïde sexuel   | Pépin         |
| Estrone                 | Stéroïde sexuel   | Pépin         |
| Testostérone            | Stéroïde sexuel   | Pépin         |
| $\gamma$ -tocophérol    | Tocophérol        | Pépin         |
| Coumestrol              | Coumestan         | Pépin         |
| Pelletiérine            | Alcaloïde         | Tronc, racine |

## 2.6. Répartition géographique du grenadier :

Le grenadier est le plus fortement représenté au Moyen-Orient (zone IV, Figure 11) son territoire d'origine par conséquent, on le trouve fréquemment en Afghanistan, en Turquie, dans la région du Caucase et en Inde (régions, figure I , II , II a, et III). Il est également cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc (la cinquième région, figure 11). On le rencontre déjà plus rarement dans le sud de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée. Même chose en Amérique (Zone VII, VIII, VIIIa et VIIIb, figure 11), la culture de la grenade est encore très sporadique. Il est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride (Wald, 2009 ; Hmid, 2013)

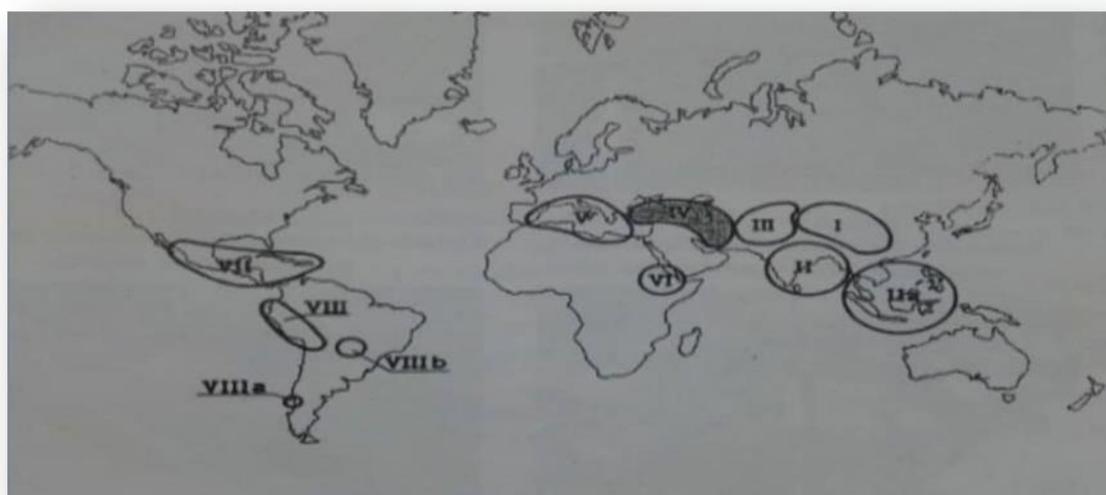


Figure 10 : Répartition géographique du grenadier.

**2.7. Utilisation traditionnelle du *Punica granatum* L :**

Ils sont traditionnellement utilisés dans l'alimentation quotidienne, les différentes parties de la grenade est utilisés en médecine traditionnelle dans de nombreux pays du monde pour des certaines d'années. Grace aux recettes de grands-mères, cet arbre représente un candidat potentiel dans le cadre du développement de nouvelles stratégies préventives de l'apparition des diverses maladies, d'autre usages sont également présents tels que teintures, décorations et cosmétiques naturels (**sitzia., 2009**)

**Tableau 05 :** Utilisation des différents du grenadier en médecine traditionnelle (Wald., 2009 ; sitzia., 2009)

| Orange utilisé                             | Fins thérapeutiques   | Région/pays             |
|--|---|-------------------------|
| <b>Fleurs</b>                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anthelminthique et astringent.</li> <li>- Traiter la diarrhée et la dysenterie, les hémorragies passives, les écoulements muqueux avec atonie, la leucorrhée et la blennorrhée et des gencives.</li> </ul>   | Chine et Egypte         |
| <b>Ecorce de grenade</b>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Effets vermifuges.</li> <li>- Anthelminthique.</li> <li>- Traiter la diarrhée et la dysenterie, les hémorragies passives, les écoulements muqueux avec atonie, la leucorrhée et la blennorrhée, le gonflement atonique des amygdales et le relâchement de la luelle et des gencives</li> </ul> | Egypte                  |
| <b>Graines de grenade</b>                  | Soulager les ulcères atoniques.   | Chine                   |
| <b>Jus de grenade</b>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité.</li> </ul>   | Afrique du Nord et Inde |
| <b>Peau de grenade (<i>malicorium</i>)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Effets astringents pour l'intestin, pour "arrêter le sang" et pour "chasser les parasites", diarrhée et dysenterie chroniques, présence de sang dans les selles, prolapsus rectal, spermatorrhée, hyperménorrhée, pertes blanches, accumulation de parasites, douleurs abdominales.</li> </ul> | Chine                   |

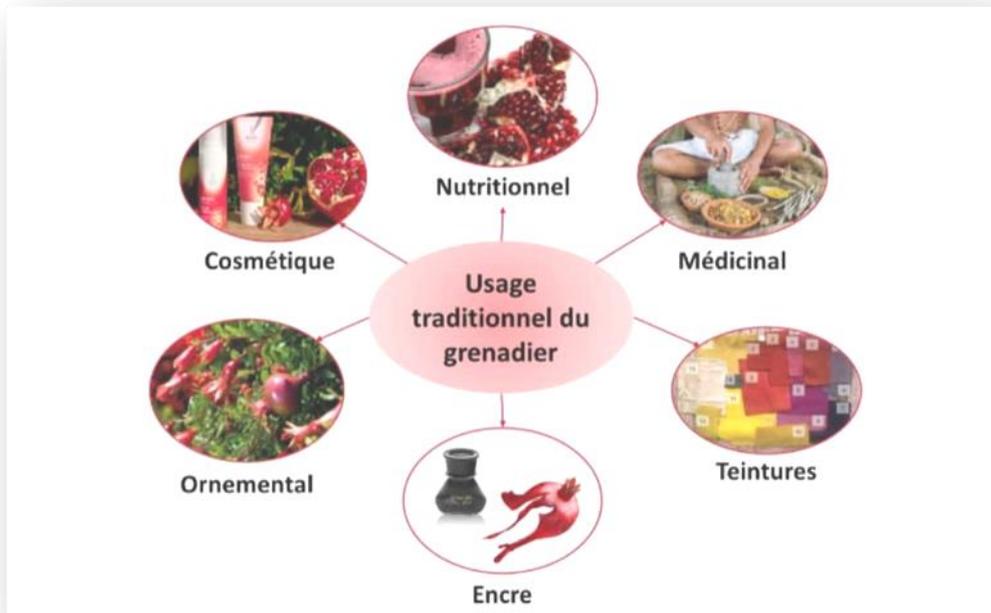


Figure 11 : Utilisation traditionnelle du *Punica granatum* L. (Sitia., 2009)



## 1. Les métabolites primaires :

Les métabolites primaires sont les molécules qui existent dans toutes les cellules végétales et qui sont nécessaires à la vie de la plante. Ils constituent la base de la machinerie moléculaire de la cellule. Les hydrates de carbone, les lipides et les acides aminés sont des exemples importants de métabolites primaires (Hopkins., 2003).

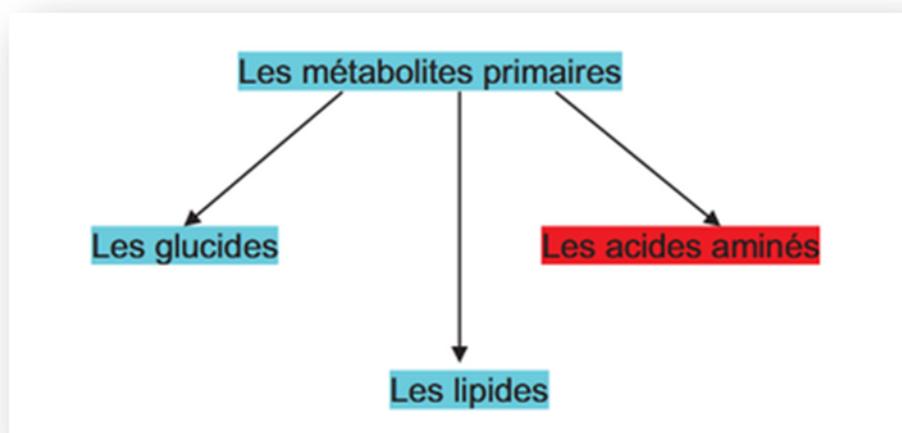


Figure 12 : Les métabolites primaires.

### 1.1. Les glucides :

La majeure partie de la matière organique est constituée de glucides, qui sont principalement synthétisés par les plantes et, avec les lipides et les protéines, constituent une part importante de l'alimentation animale et humaine (Hopkins., 2003).

Il est fabriqué par les plantes et, avec les graisses et les protéines, il constitue une part importante de l'alimentation animale et humaine (Hopkins., 2003).

Les glucides sont aussi appelés lipides en raison de leur présence de La formule  $C_n(H O)$  correspond à des molécules organiques caractérisées par la présence de chaînes carbonées porteuses de groupements hydroxyles, de fonctions aldéhydes ou cétones et éventuellement une fonction carboxyle ou amine (Touitou., 2005).

### 1.2. Les acides aminés :

Les acides aminés sont des molécules qui possèdent : une fonction acide carboxylique et une fonction amine primaire portées par le même atome de carbone.

La fonction acide carboxylique et la fonction amine primaire portées par le même atome de carbone  $\alpha$  (C2, C1 étant l'atome de carbone carboxyle).

Ce sont des acides  $\alpha$  aminés. Ils varient selon la nature de la chaîne latérale (ou radical). Plus de 300 acides aminés ont été recensés : 20 acides aminés sont présents dans les protéines naturelles (Mossard., 2006).

### 1.3. Les lipides :

Il forme un groupe de substances chimiquement hétérogènes, insolubles dans l'eau et les solvants polaires, mais solubles dans les solvants non polaires comme le chloroforme et hydrocarbures (Strier., 1997).

#### 1.3.1. Les types des lipides :

##### A. Les lipides simples :

##### A.1. Les acides gras saturés :

Les chaînes aliphatiques des acides gras saturés ne contiennent pas de double liaison, d'où leur nom générique. Par conséquent, seule la fonction carboxylate a des propriétés de réaction (Mason., 2007).

##### A.2. Les acides gras insaturés :

Caractérisés par présences d'une ou de plusieurs doubles liaisons :

- ✓ Une réactivité chimique plus grande
- ✓ L'existence possible d'une isomérisation cis/trans (Aoul., 1989).

##### B. Les lipides à plusieurs fonctions :

- ✓ Ce sont des composants essentiels de la structure des membranes biologiques.
- ✓ Ce sont des substances de réserve métabolique intracellulaire.
- ✓ Il fonctionne pour transférer l'énergie métabolique Ce sont des composants structurels de la protection externe de la cellule (David., 1996).

#### 1.3.2. Classification :

Il est aussi possible de classer les lipides en deux grands groupes en fonction de leur composition atomique : les lipides simples et les lipides complexes.

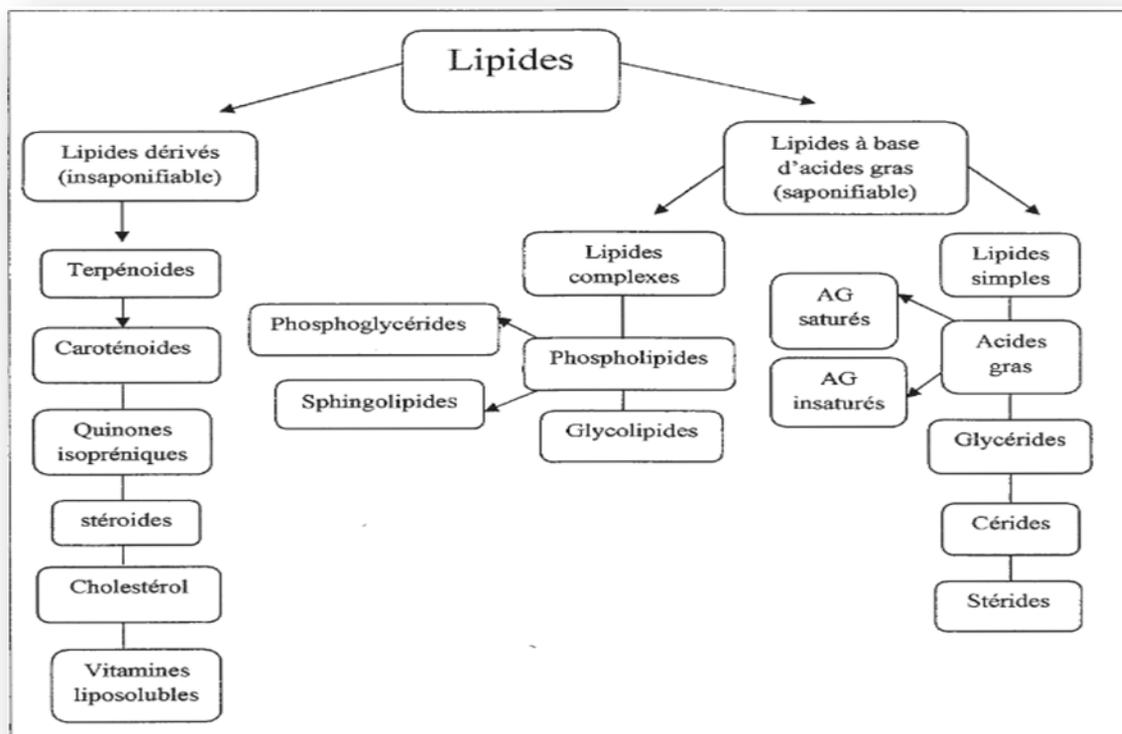
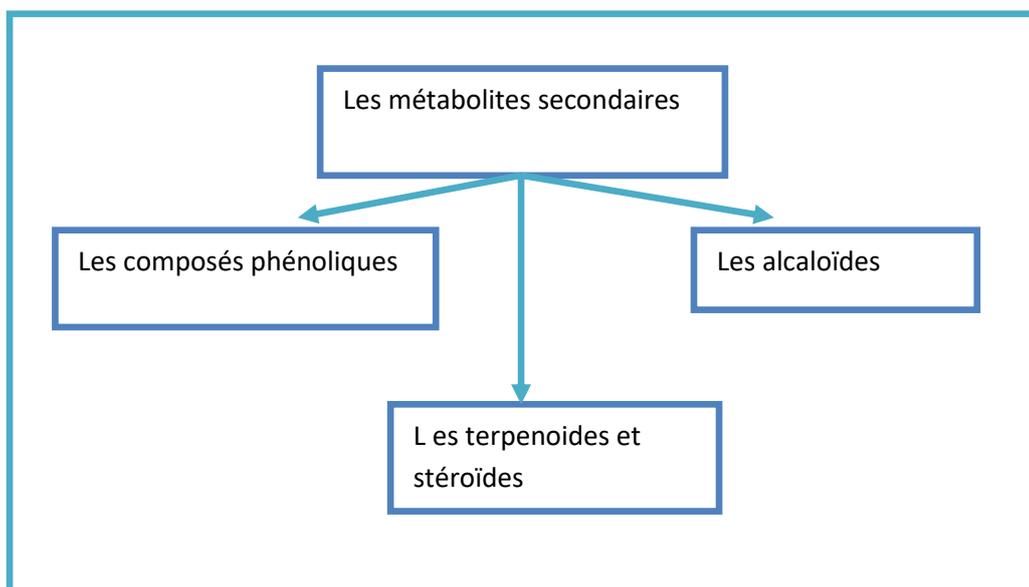


Figure 13 : Classification les lipides.

## 2. Les métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires des plantes peuvent être définis comme des molécules indirectement nécessaires à la vie végétale, contrairement aux métabolites primaires (Protéines, lipides et glucides). Ces métabolites secondaires sont impliqués dans la structure des végétaux (lignine et tanins) mais qui ont un effet décisif sur eux. Adaptation des plantes à leur environnement (Mansoor., 2009). Ils participent ainsi, d'une part, à une méthode très efficace, chez les plantes tolérantes à différents stress : action contre les herbivores (menthe par exemple), inhibant les agents pathogènes des bactéries et des champignons, insectes prédateurs, résistants à la sécheresse et aux rayons ultraviolets. Mais ils pourraient l'être. Anti nutriments. De nombreux métabolites secondaires sont toxiques, ils sont donc stockés dans des vésicules spécifiques ou dans la vacuole (Sandrin., 2004). D'un point de vue appliqué, ces molécules sont à la base des principes actifs qui on les trouve dans les plantes médicinales (Mansour., 2009).



**Figure 14 :** Les métabolismes secondaires.

## 2.1. Les composés phénoliques :

### ➤ Définition :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui forment un groupe largement répandu dans le monde végétal. Trouvé dans les plantes, à partir des racines Jusque dans le fruit (Achat., 2013). Les polyphénols contiennent un ou plusieurs noyaux Les substances aromatiques, qui sont attachées à un ou plusieurs groupes hydroxyle (Bronton., 1993 ; Watson., 2018). Il existe environ 8000 composés phénoliques (Beta et al., 2005). par numéro des motifs phénoliques présents, appelés indifféremment composés phénoliques ou Les polyphénols, qui contiennent principalement des phénols simples, des acides phénoliques, Les polyphénols, qui contiennent principalement des phénols simples, des acides phénoliques, Lignine et xanthones (Hennebelle et al., 2004, Hurtado-Fernandez et al., 2010 ; Alara et al., 2021).

### 2.1.1. Tanins :

#### ➤ Définition :

Les tanins sont des substances polyphénoliques de compositions différentes, qui ont en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre résistante à la pourriture. Ce

matériau a Ils se combinent avec des protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. (Baba Issa., 2011; Cartier et Roux., 2007).

### A. Tanins hydrolysables :

#### ➤ Définition :

Ce sont des esters d'un sucre ou d'un polyol et d'un nombre variable de molécules de phénol (souvent de l'acide gallique) (Cartier et Roux., 2007).

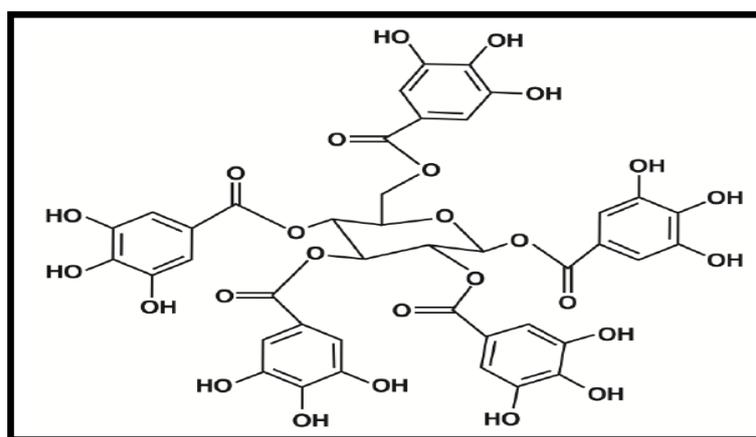


Figure 15 : Structure de base des tanins hydrolysable (Haslam., 2007).

### B. Tanins condensés :

#### ➤ Définition :

Les tanins ont une structure similaire à celle des flavonoïdes, mais leurs molécules ne contiennent pas de sucre. Leurs molécules. Ils ont tendance à se polymériser en produits rouge-brun (Cartier et Roux., 2007).

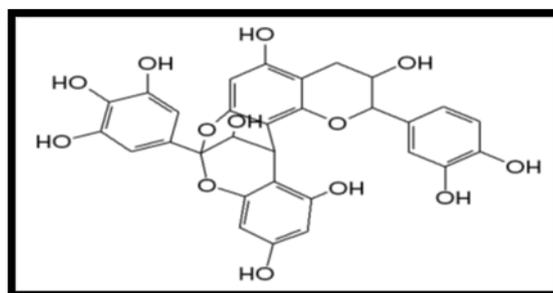


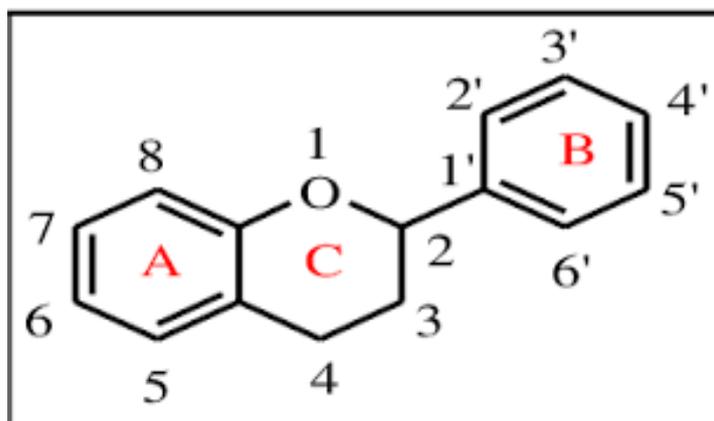
Figure 16 : structure chimique du tanin condensé.

### 2.1.2. Flavonoïde :

#### ➤ Définition :

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9 000 composés différents et sont généralement distribués dans toutes les espèces végétales. Leur squelette chimique commun comporte 15 atomes de carbone, composé de deux anneaux benzéniques A et B reliés par un anneau pyranique central C (**Figure 17**). Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les cycles A et B, et la nature du C. Les flavonoïdes sont divisés en différentes catégories, dont les plus importantes sont les flavonols, et les anthocyanines (**Bruneton, 2009**). Ces molécules se retrouvent à la fois sous forme libre, mais sont très souvent liées à des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie aglycone ou génin phénolique. Aglycone ou d'une partie phénolique génique associée à un sucre. Ils sont localisés dans différents organes : les fleurs, les fruits, les feuilles, les tiges et les racines. Les aglycones se trouvent plutôt sous forme de cire dans les feuilles, les écorces et les bourgeons la couleur des fruits, et des fleurs.... (**Hernández., 2009 ; Hernández., 2009 ; washing., 2000**).

#### ➤ Structure :



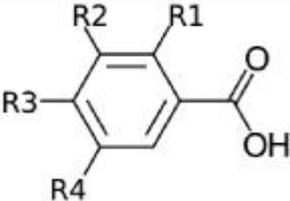
**Figure 17** : Squelette de base des flavonoïdes (**Erlund., 2004**).

### 2.1.3. Acide phénolique :

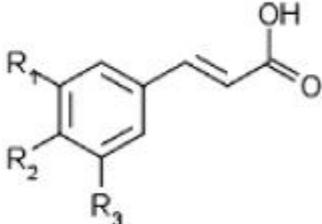
#### ➤ Définition :

Ce sont des composés constitués d'un ou plusieurs cycles benzéniques avec une ou plusieurs fonctions carboxyliques, dérivés des acides benzoïque et cinnamique, dont l'acide férulique, caféïque et p-coumarique (**Bruneton, 1993; Velazquez et al., 2003**). Les acides phénols comprennent deux sous classes :

**A. Acide hydroxybenzoïques :****Tableau 06 :** Exemples de dérivés de l'acide benzoïque identifiés chez des plantes halophytes (Ksouriet *al.*, 2012).

| Squelette   | Composé          | R1 | R2               | R3 | R4 |
|---|------------------|----|------------------|----|----|
|  | Acide vanillique | H  | OCH <sub>3</sub> | OH | H  |
|   | Acide gallique   | H  | OH               | OH | OH |

**B. Acide hydroxycinnamiques :****Tableau 07 :** Exemples de dérivés de l'acide hydroxycinnamique rencontrés chez des plantes halophytes (Ksouriet *al.*, 2012).

| Squelette de base   | Composé                    | R1               | R2 | R3 |
|---|----------------------------|------------------|----|----|
|  | Acide <i>p</i> -coumarique | H                | OH | H  |
|   | Acide férulique            | OCH <sub>3</sub> | OH | H  |
|   | Acide caféique             | OH               | OH | H  |

**2.1.4. Anthocyane :****➤ Définition :**

Ce sont des composés hydrosolubles de couleur rouge, violette ou bleue qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Seuls les hétérosides sont appelés anthocyanosides. Ces pigments sont répandus dans le règne végétal. Ils sont similaires aux flavonoïdes par leur origine, leur structure et leurs propriétés pharmacologiques, Composition et propriétés pharmacologiques (Cartier., 2003 ; Cartier et Roux., 2007).

### 2.1.5. Coumarine :

➤ **Définition :**

Ils résultent du métabolisme de la phénylalanine et de l'acide shikimique par estérification et cyclisation, qui se forment par substitution sur un cycle aromatique analogue à celle des dérivés l'acide cinamique. presque toutes les coumarines sont substituées par un hydroxyle en position C7 (Maarouf et Raynaud., 2007; Kumar et al., 2015).

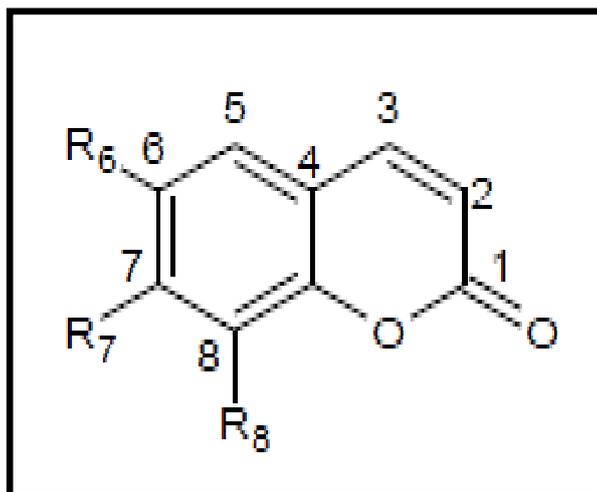


Figure 18 : Squelette de base des coumarines (Djemoui., 2012).

### 2.2. Les alcaloïdes :

➤ **Définition :**

Un alcaloïde est une substance organique azotée à caractère alcalin et à structure complexe. Structure Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique (Badiaga., 2011). Les alcaloïdes sont des structures très diverses de différents acides aminés ou Acide mévalonique par différentes voies de biosynthèse (Suhr & Nielsen, 2003).

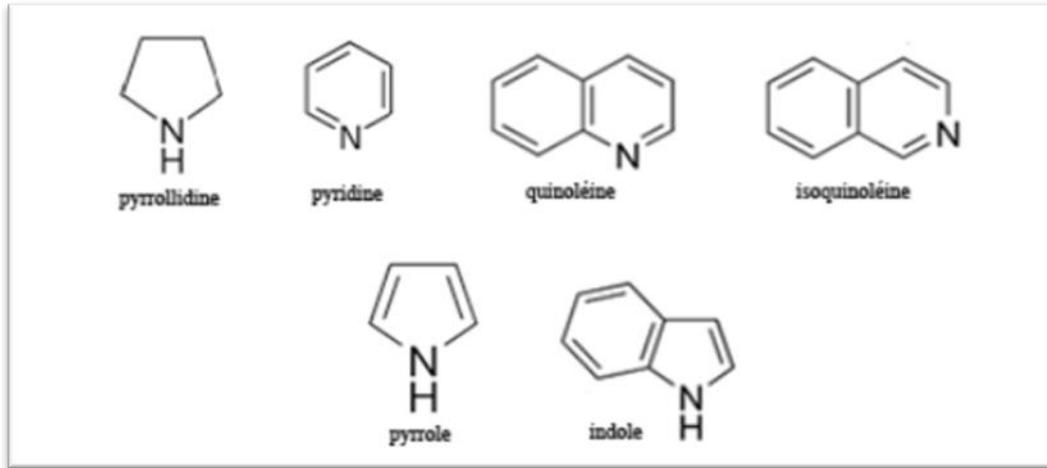


Figure 19 : Structure d'alcaloïdes (Maldonado., 2012)

## ***Chapitre III***

# ***Les activités biologiques et les colorants azoïques***



## **1. Activité Antioxydant :**

### **1.1. Introduction :**

Qu'est-ce que toutes les maladies suivantes ont en commun : les maladies cardiaques, le cancer, Hypertension, peau ridée, taches de vieillesse, arthrite, cataracte et mauvaise mémoire ? Un seul On Pourrait dire que toutes ces affections sont associées à l'âge, mais l'âge n'en est pas la cause.

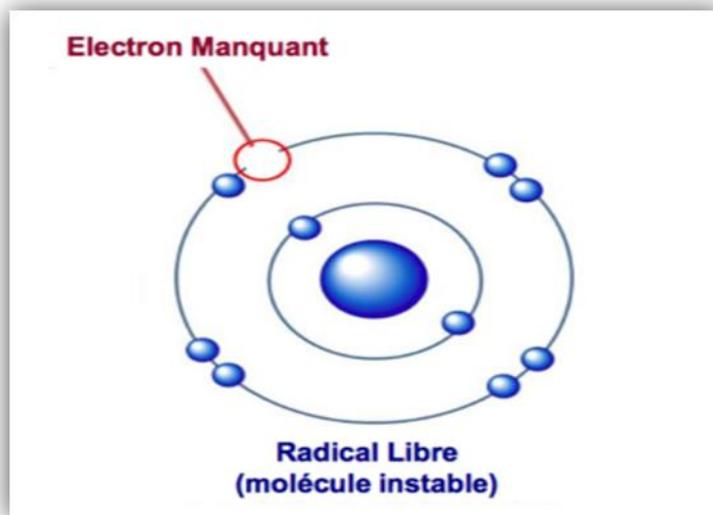
En effet, même des personnes jeunes souffrent de certaines de ces maladies. Ce qui unit ces conditions, ainsi que de nombreuses autres maladies dégénératives. Ce sont les radicaux libres (Fife., 2017).

### **1.2. Définition des Radicaux libres :**

Les Radicaux libres sont des entités moléculaires rebelles qui provoquent la destruction de tout le corps. Ce sont des particules instables qui ont perdu un électron, ce qui les rend ils sont très réactifs dans leur recherche d'équilibre, ils lui « volent » des électrons aux molécules voisines (Fife., 2017).

Un radical libre est défini comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule ayant un électron non apparié (célibataire) sur son orbite externe (Jadot., 1994).

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés dans son orbite externe La présence d'un électron non apparié conféré à ces moléculaire une instabilité importante (Karang., 2010).



**Figure 20 : La formule des radicaux libre**

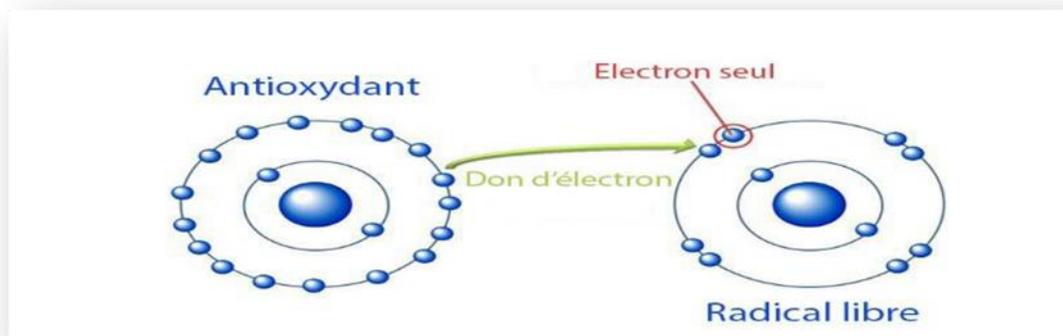


Figure 21 : Neutralisation d'une radicale libre par un antioxydant (carange., 2010)

### 1.3. Evaluation de l'activité antioxydante :

Mesure de l'activité anti radicalaire par le DPPH.

- **Principe** : la méthode utilisée a été celle de (parejo et al., 2000) qui est le texte au 1.1 dephenyl-2picrylhydrazyle (DPPH). En effet, la réduction du DPPH par un capteur de radicaux libres s'accompagne de son passage de la couleur violeta la couleur jaune, mesurable à 517nm. Une faible absorbance traduit une forte inhibition du DPPH et donc une forte activité anti radicalaire.

Tableau 08 : Principaux radicaux libres et leur structure chimiques (Hatone., 2005)

| Radicaux libres (nomenclature) | structure chimiques           |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Radical Hydroxyde              | OH                            |
| Radicalhydro peroxyde          | HOO                           |
| Radical Alkoxyde               | RO                            |
| Radical peroxyde               | ROO                           |
| Anion super oxyde              | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   |
| Monoxyde d'azote               | NO                            |
| peroxynitrite                  | ONOO                          |
| Peroxyde d'hydrogène           | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |

#### 1.4. Stress oxydant :

Stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par les systèmes de défense antioxydants (Boyd *et al.*, 2003 ; Niki, 2018 ;Tu *et al.*,2019).

Dans des circonstances normales la balance antioxydant/pro-oxydant est équilibrée, si ce n'est pas le cas, soit à cause d'un déficit en antioxydants, soit à cause d'une énorme surproduction de radicaux, L'excès de ces radicaux est appelé stress oxydatif (Favier, 2003;Durackova, 2008; Matschke *et al.*, 2019).

Les radicaux libres peuvent causer des dommages importants à la structure et métabolisme cellulaire en décomposant de nombreuses cibles : protéines, graisses et acides nucléaire. Il a toujours été considéré comme un sous-produit toxique du métabolisme normal de l'oxygène qui est impliqué dans de nombreuses maladies (Angelos *et al.*, 2005;Migdal *et Serres*, 2011; Lohan *et al.*, 2021)

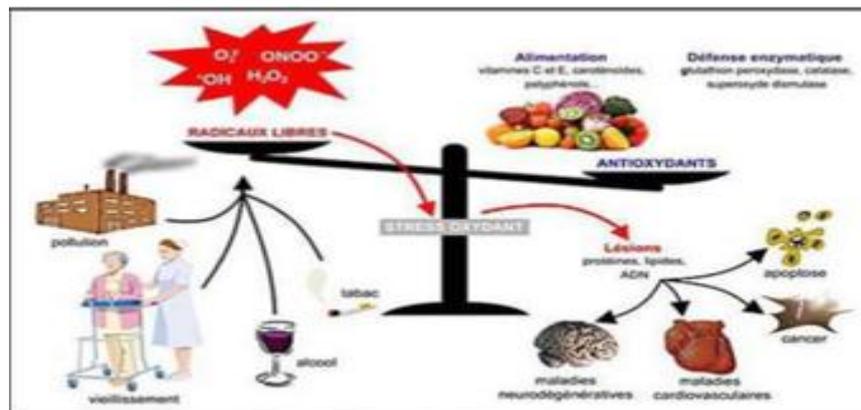


Figure 22 : stress oxydant (durakova, 2008)

#### 1.5. Antioxydants :

##### 1.5.1. Définition :

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à une concentration relativement faible, d'entrer en composition avec d'autres substrats oxydables et ainsi de retarder concentration, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Di alles., 2005).

Les cellules consomment beaucoup antioxydants et stratégies d'efficacité énergétique pour contrôler leurs niveaux espèces réactives de l'oxygène (Dias., 2019). De même, les antioxydants sont des composés puissants capables de neutraliser les radicaux libres impliqués dans la

dégradation cellulaire, Ainsi, il nous aide à maintenir une vie active et saine. Certains antioxydants sont fabriqués par le corps humain, comme les vitamines et les polyphénole doivent être apportés par notre alimentation (**Partikova et al., 2021**)

Les antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action et leur emplacement des cellules et leur origine (**delattre et al., 2005 ; Kumar et al., 2017**).

### **1.5.2. Classification des antioxydants :**

#### **A. Antioxydants endogènes :**

Ce sont des antioxydants d'origine endogène qui contrôlent les radicaux libres et les bienfaits le travail des cellules (**Desmier., 2016**).

#### **B. Antioxydant enzymatique oncogène :**

Les cellules possèdent un système antioxydant enzymatique qui joue un rôle important dans l'inactivation des espèces réactives de l'oxygène et le contrôle de stress oxydatif (**Rudneva, 2014**).ce système intervenir plusieurs enzymes dont les plus importants sont : la superoxyd dismutase (SOD), la catalase (CAT) ,et la glutahion peroxydase (GPX) , mais aussi la glutahion réductase (GR) (**Van der Oost et al, 2003 ; Nikinmaa., 2014**).

### **2. Activité antibactérienne :**

Les bactéries sont des microbes composés de cellules uniques, visibles au microscope, qui appartiennent à la zone de transition entre les règnes animal et végétal. Ces micro-organismes sont présents dans l'air, le sous-sol, l'eau douce, l'eau de mer, la peau et les surfaces muqueuses, ainsi que dans les voies digestives, respiratoires et urinaires. Ce sont les hôtes naturels de l'homme et donc saprophytes (flore digestive par exemple), ou ils déterminent l'infection et donc l'agent pathogène. Pour que les bactéries se développent, il faut que des conditions physico-chimiques favorables soient trouvées dans le milieu extérieur, et ces conditions sont réunies dans le milieu de culture développé par l'homme pour l'étude des bactéries, d'où le terme milieu de culture (**Leclerc et al., 1995 ; Madigan et al., 1997 ; Marc et al., 2001 ; Khiati., 1998**). Il est bien connu que le traitement des infections bactériennes dépend principalement de l'utilisation d'antibiotiques (l'activité antibactérienne inhibe ou tue complètement le développement des bactéries) (**Ali-Shtayeh et al., 1998 ; Nicola et Danil., 1998**).

## **2.1. Définition de l'activité antibactérienne :**

L'activité antibactérienne correspond à une résistance accrue aux antibiotiques et l'activité d'une molécule présente au sein d'un végétal qui inhibe ou tue complètement le développement bactérien à de très faibles concentrations. La sensibilité des bactéries aux agents antibactériens varie selon la nature de l'agent antibactérien. (Alexandra *et al.*, 2013 ; Nicola et Daniel., 1998).

## **2.2. Les principales substances antibactériennes :**

### **2.2.1. Les bactéries :**

Les bactéries sont des micro-organismes vivants formés d'une seule cellule procaryote de taille 1000 fois plus petite qu'une cellule eucaryote typique et appartiennent à la zone de transition entre le règne animal et végétal. Certaines bactéries peuvent se déplacer grâce aux vibrations ciliaires et se répliquer selon deux modes ; la division simple ou scissiparité et sporulation (la spore représentant la forme de résistance et de propagation du germe). Ils sont généralement divisés en deux types différents, Gram-positif et Gram-négatif, qui diffèrent par les propriétés des parois cellulaires bactériennes. (Leclerc *et al.* 1995 ; Madigan *et al.* 1997 ; Marc *et al.* 2001 ; Alexandra *et al.*, 2014 ; Nicklin *et al.*, 2000).

### **2.2.2. Les antibiotiques :**

Les antibiotiques sont des produits chimiques produit par des microorganismes ; ces substances ont la capacité d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes (bactéries) (Khiati., 1998). Il possède des nombreuses propriétés, dont une toxicité sélective contre les maladies bactériennes ou fongique, un mécanisme d'action précis contre des cibles spécifique, sa fonction physiologique est restreinte, et il est actif et capable de se diffuser dans les milieux organiques. (Monsieur., 2005).

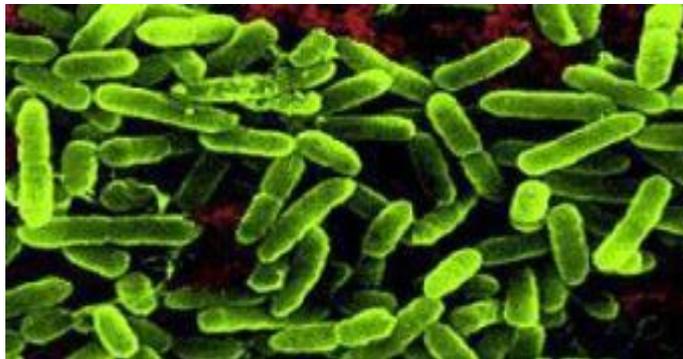
La fonction des antibiotiques est d'inhiber les bactéries et d'empêche le développement des microorganismes ; ils ont un effet bactéricide et peuvent détruire les bactéries (Garnier Delamare, 1992; Khiati M 1998).

### 2.3. Micro-organismes utilisés :

#### 2.3.1. Bactéries à gram négatif :

##### A. Genre *Pseudomonas* :

Le genre appartient à la famille *Pseudomonadaceae*, une famille des bactéries en forme de bâtonnets, mobiles par cils polaires, strictement aérobies. Certaines populations de bacilles agissent comme des bactéries opportunistes, provoquant souvent des infections nosocomiales. Une des plus redoutables est *Pseudomonas aeruginosa* (germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C) (Leclerc et al., 1995 ; Philippon, 1995).



**Figure 23 :** Le *Pseudomonas aeruginosa* sous le microscope électronique (Elmeskini., 2011).

##### B. Genre *Escherichia* :

Le genre comprend 5 espèces, mais *E. coli* est la plus importante. Les membres d'*E. coli* des Enterobacteriaceae sont généralement mobiles, mais parfois non. C'est l'espèce la plus souvent impliquée dans les infections aiguës des voies urinaires, et provoque également des diarrhées estivales, des diarrhées porteuses infantiles et les intoxications alimentaires. Il a des propriétés spéciales, telles que la facilité de manipulation, la disponibilité des séquences génomiques entières et sa capacité à se développer dans des conditions aérobies et anaérobies. Cela fait de lui un hôte important dans le domaine de la biotechnologie. (Leclerc et al., 1995 ; Allocati et al., 2013 ; Percival., 2004).

#### 2.3.2. Bactéries à gram positif :

##### A. Les *Streptocoques* :

Sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où son nom (en grec staphylos), qui se subdivisent en trois genres majeurs selon les études phylogénétiques : le genre *Streptococcus*, *Enterococcus*,

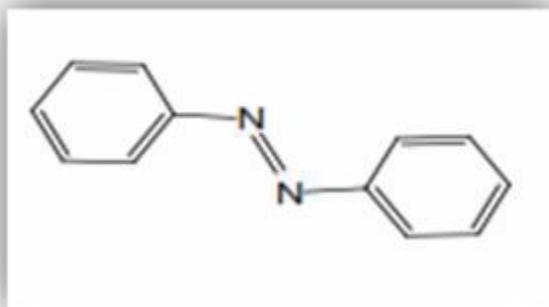
et *Lactococcus*. Les *staphylocoques* sont des bactéries ubiquitaires largement distribuées dans l'environnement naturel humain, mais elles sont plus courantes et plus denses sur la peau et les muqueuses des mammifères. (Leclerc et al. 1995).

### 3. Les colorants azoïques :

Les colorants azoïques sont des composés aromatiques découverts par P. Griess en 1858, ces structures sont caractérisées par un groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux radicaux alkyle ou aryle identiques ou non (azoïques symétriques et dissymétriques). Ils reposent généralement sur le squelette de l'azobenzène sont des systèmes aromatiques où pseudo-aromatiques liés par un groupe chromophore azoïques, selon le nombre de chromophoreazoïques rencontrés dans la molécule on distingue mono-azoïques, bis-azoïques et poly-azoïques. (Chang et al., 2001 ; Maclaren., 1985 ; Guivarch., 2004 ; Robert et al., 2000 ; Guillard et al., 2003).

#### 3.1. Les types des colorants azoïques :

- ✓ Les colorants basiques
- ✓ Les colorants acides
- ✓ Les colorants directs et réactifs solubles dans l'eau,
- ✓ Les colorants dispersés et à mordant non-ioniques insolubles dans l'eau. (Kadirvely et al., 2003)



**Figure 24 :** Structure chimiques des colorants azoïques.

# *Partie 2*

## *Etude expérimentales*



# *Chapitre I*

## *Matériels et méthodes*



## 1. Matériel et méthode

### 1.1. Matériel végétal

#### ➤ Echantillonnage

Le but de notre travail était de réaliser une étude phytochimique de deux plantes utilisées comme colorants naturels et de comparer leurs activités biologiques (antioxydant et antibactérienne) avec un colorant azoïque synthétique.

La plante de Grenade a été récoltée dans la région de Mila en mois de novembre 2021, les écorces du fruit ont été découpées en petites morceaux et séchées à l'ombre dans un endroit bien aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière, pour préserver le maximum de molécules.

Une fois les écorces isolées elles sont broyées. La poudre végétale obtenue est conservée à l'abri de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermés.



**Figure 25 :** Ecorce du fruit de la grenade sèche

Le carthame en été achetée chez l'herboriste de région d'Alger sous la forme sèche, ensuite elle est broyée. La poudre végétale obtenue est conservée à l'abri de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermés.



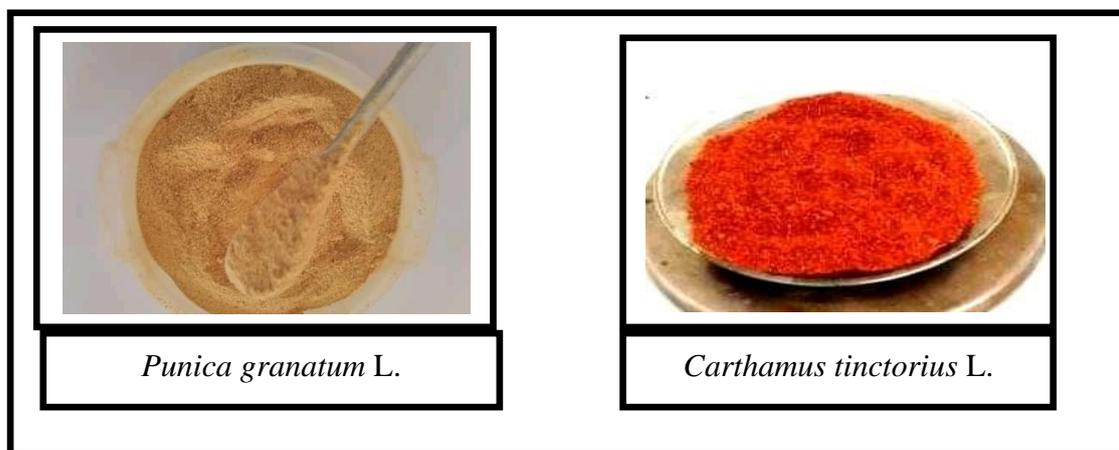
**Figure 26 :** *Carthamus tinctorius* L.

## 1.2. Méthodes :

### 1.2.1. Préparation de matériel végétal :

#### ➤ Broyage et tamisage :

Les écorces de la *Punica granatum* L. et le *carthamus tinctorius* L. ont été broyées avec un broyeur électronique (**figure 27**); ces dernières ont été récupérées après tamisage et conservées dans des flacons en verre hermétiques à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.



**Figure 27 :** Préparation du matériel végétal (broyage et tamisage)

### 1.2.2. Analyse qualitative :

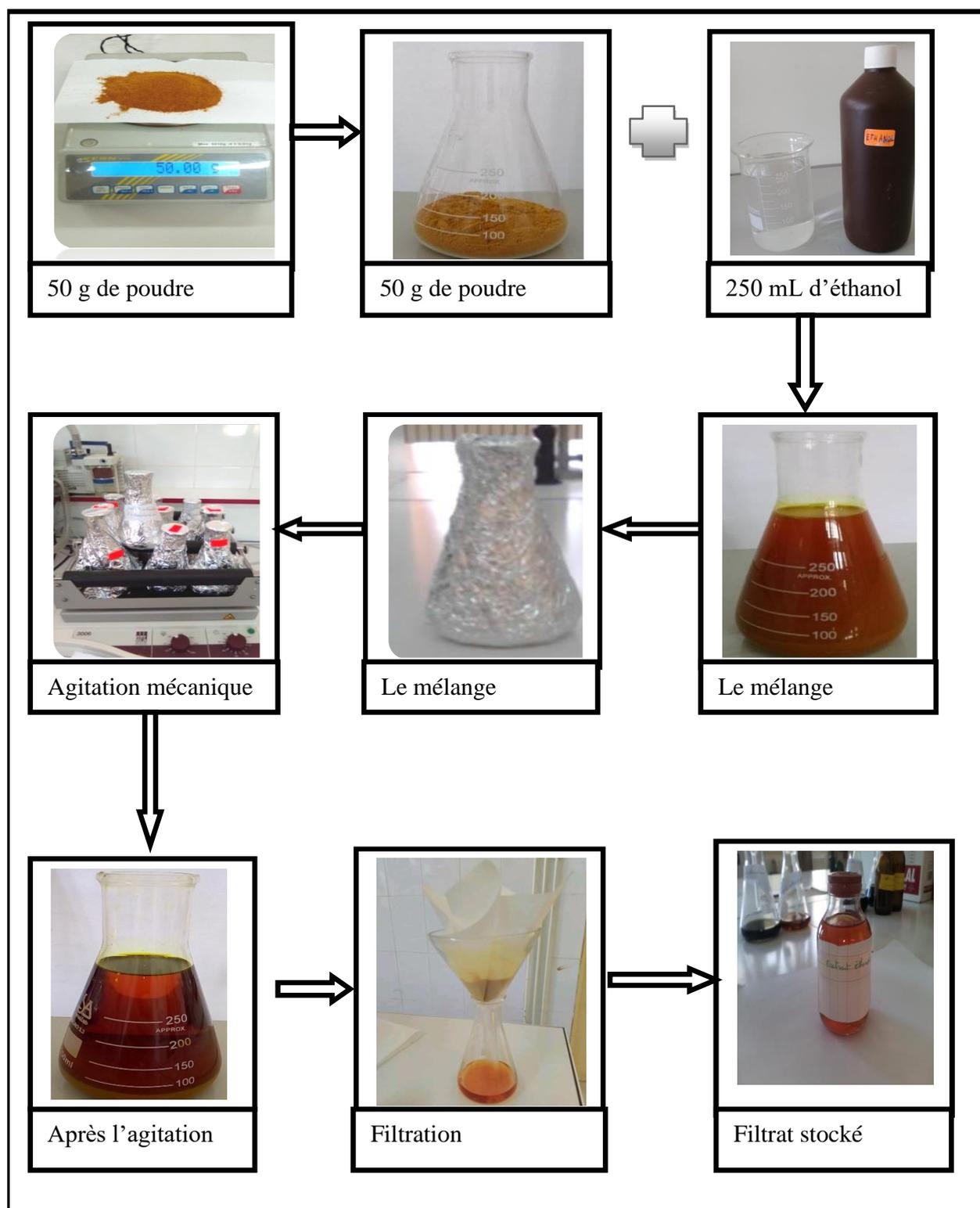
Cette analyse nous permet d'utiliser les réactifs spécifiques de chaque famille de composés sur la présence ou l'absence de groupes chimiques contenus dans la plante par des réactions de coloration ou de précipitation (Cette analyse est effectuée dans le laboratoire d'Abdelhafide Boussoufe Mila, Centre Universitaire).

**1.2.2.1. Screening phytochimique :****A. Préparation des extraits végétaux :**

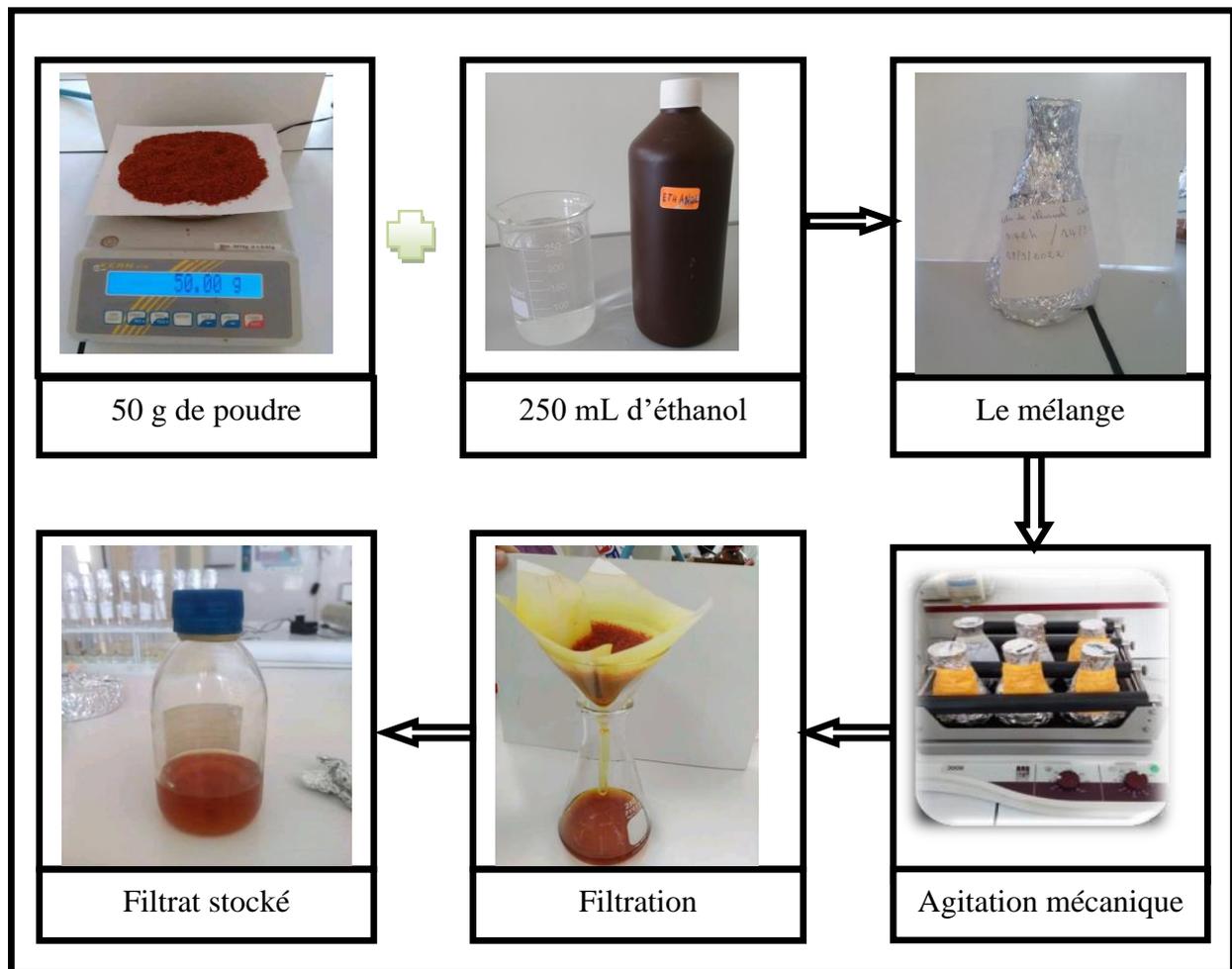
La macération a été utilisée comme méthode d'extraction, et celles-ci étaient basées sur la macération du matériel végétale dans le solvant à température ambiante, et le temps nécessaire à l'expérience. Cette étape est conçue pour à extraire au maximum des molécules chimiques, et pour augmentent le rendement d'extraction des composés phénoliques (**Lumbu et al., 2005 ; Madi., 2009 ; Singh, 2008**).

**A.1. Préparation de l'extrait éthanolique :**

Macérer 50 g de matière végétale (poudre fine) dans 250 ml d'éthanol (80%) pendant 3 jours à température ambiante sous agitation mécanique. Après 3 jours, le produit obtenu a été filtré avec du papier filtre de type Wattman. Le filtrat obtenu est conservé dans un flacon en verre fermé hermétiquement et stocké à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (**Figure 28, 29**).



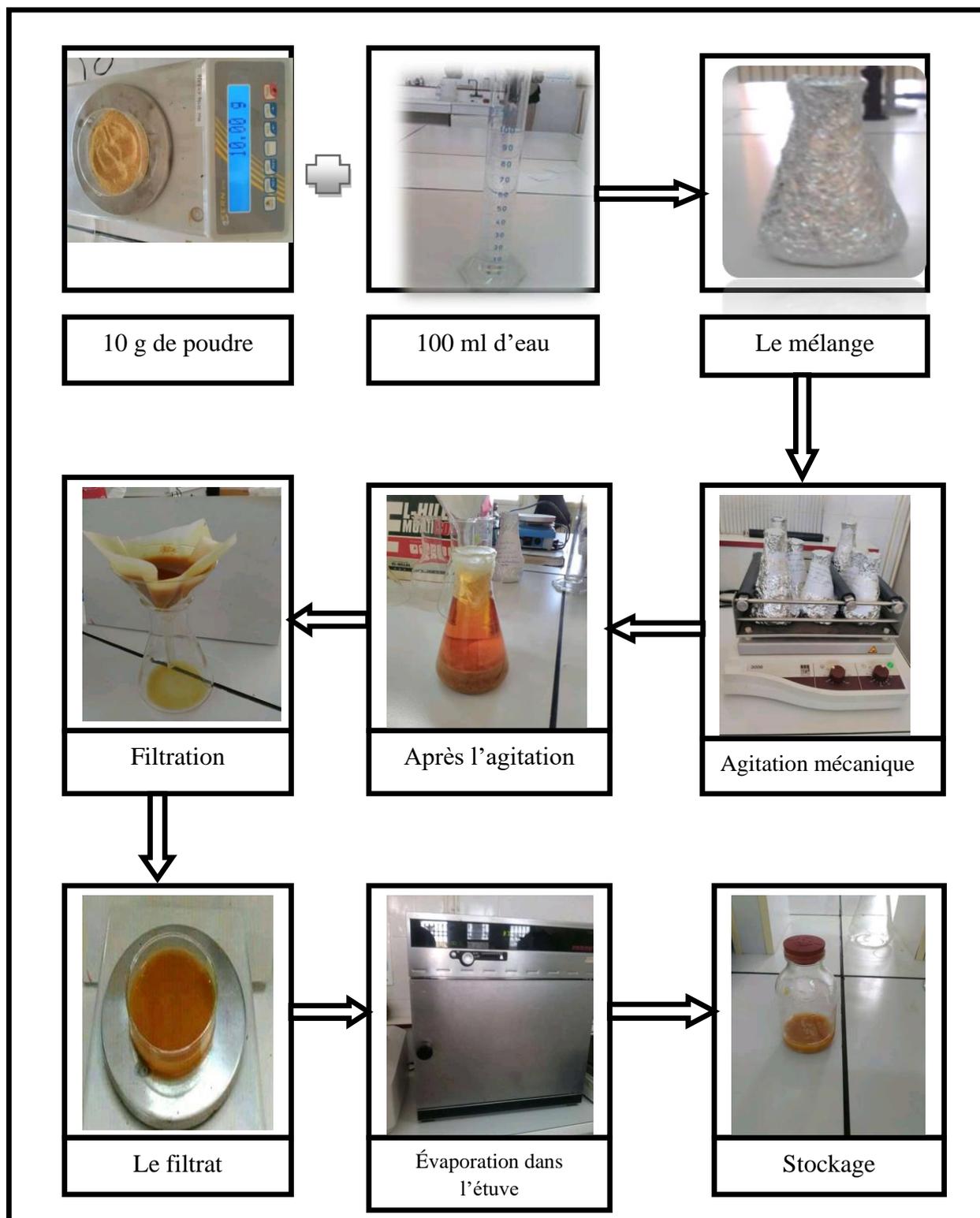
**Figure 28** : Etapes de la macération éthanolique de la grenade (*Punica granatum* L.).



**Figure 29** : Etapes de la macération éthanolique de la *Crathamus tinctorius* L.

### A.2. Préparation de l'extrait aqueux :

Pour préparer un extrait aqueux, une quantité de 10g de la matière végétales (la poudre fine) a été macéré dans 100ml d'eau distillé pendant une nuit à une température ambiante sous agitation mécanique. La solution obtenue a été filtrée à l'aide d'un papier filtre de type Wattman. Le filtrat est ensuite évaporé dans une étuve à une température de 40 °C pour éliminer l'eau (Belhattab et al., 2004).

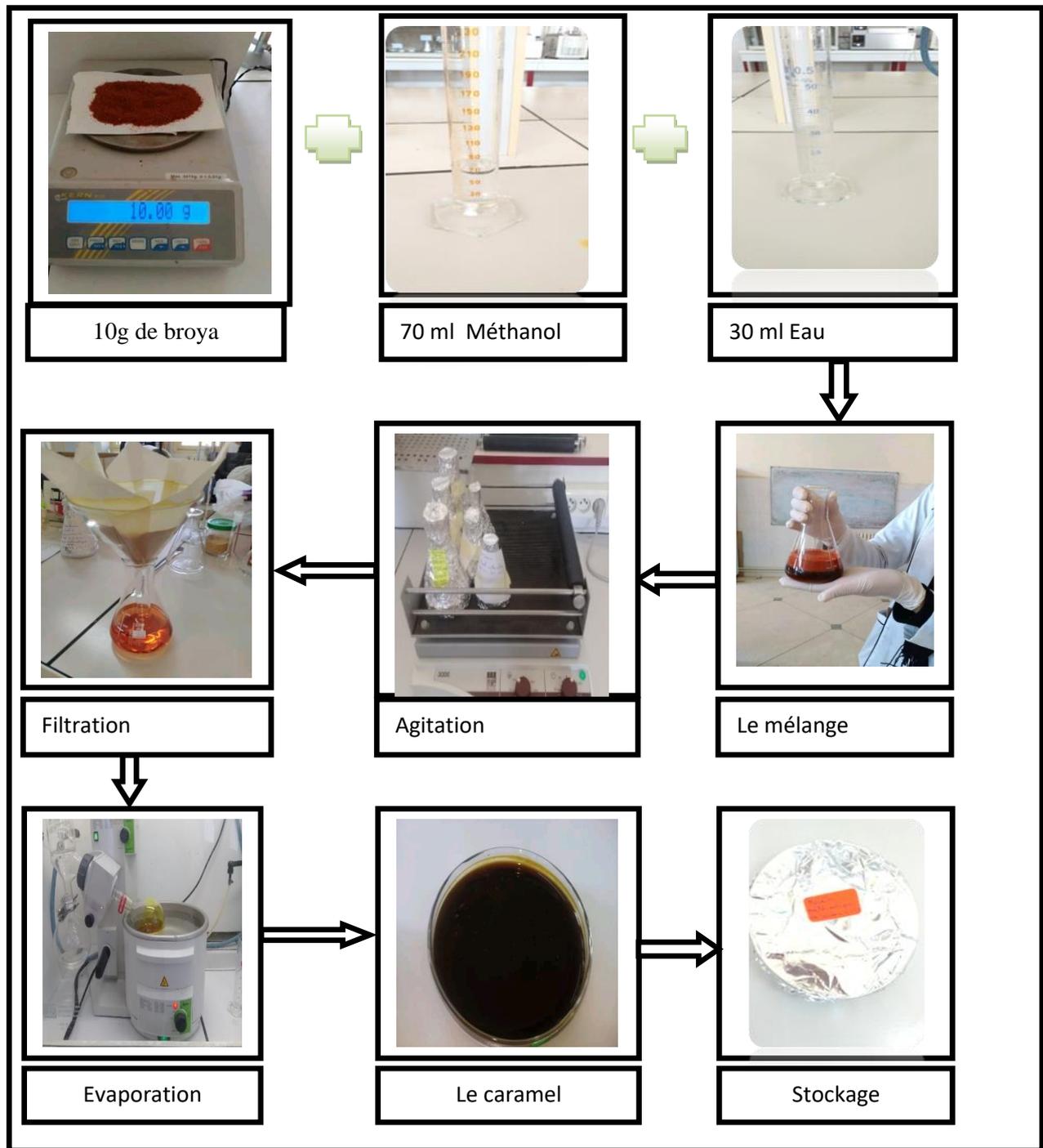


**Figure 30** : Différentes étapes de préparation de l'extrait aqueuse de la grenade.

### A.3. Préparation de l'extrait méthanolique :

Une quantité de 10g de matériel végétal broyé est macérée dans une solution de méthanol/eau (70 : 30, V/V) sous agitation mécanique à une température ambiante pendant 3 jours, le macérât a été ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre de type Wattman. Le filtrat obtenu

est soumis à une évaporation par rotavapeur. Enfin, le produit final est stocké dans une boîte de pétri en verre fermée hermétiquement à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (**Figure 32**) (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**).



**Figure 31** : Différentes étapes de préparation de l'extrait méthanolique de le *Carthamus tinctorius* L.

**A-4 Préparation de l'extrait chloroformique :**

Mélanger 1 g de la poudre avec 10 ml de chloroforme, filtrer à chaude et chauffer soigneusement au bain-marie pendant 3 min, puis ajuster le volume est à 10ml (**Diallo., 2000**)..

**B. Identification des groupes chimiques :**

| L'extrait   | Groupes chimiques | Protocole  |
|-------------|-------------------|--|
| Ethanolique | Flavonoïdes       | Ajouter dans un tube à essai, 5ml de l'extrait éthanolique, ajouter quelques gouttes d'HCl et quelques copeaux de magnésium(Mg).<br><br>L'apparition d'une coloration rose, rouge prouve la présence des flavonoïdes ( <b>Trease et Evans., 1987</b> ).  |
|             | Coumarines        | Immerger 20g de la poudre dans 40ml d'éthanol pendant 2 à 3 heures. Après macération et filtration, 5ml de KOH (10%) et 5ml d'HCl (10%) ont été ajoutés à 5 ml du filtrat. Des précipitations rouge brune indiquent la présence des coumarines ( <b>Trease et Evans., 1987</b> ).  |
|             | Alcaloïdes        | Essai par précipitation avec le réactif de Wagner. Mettre 1 ml d'extrait dans un tube à essai, puis ajouter quelques gouttes de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité rouge-orangé ou brun rougeâtre indique un test positif ( <b>Vijay et al., 2013</b> ).   |
|             | Stéroïls          | Dans un bécher, introduire 5ml d'extrait éthanolique à analyser, ajouter 5ml d'anhydrideacétique, 5ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) concentré dans la paroi dubécher sous l'hôte et sans agiter.<br><br>Laisser reposer 20 min. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact desdeux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stéroïls ( <b>Trease et Evans., 1987</b> ). |

|                       |                              |  |
|-----------------------|------------------------------|--|
|                       | <b>Glycosides</b>            | On mélanger 1ml de l'extrait brut avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling a été chauffé à 70°C dans un bain marie, un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique ( <b>Trease et Evans., 1987</b> ).  |
| <b>Aqueux</b>         | <b>Tanins</b>                | Dans un tube à essai, traiter 1ml d'extrait d'alcool avec 2 ml d'eau distillée et ajouter 2-3 gouttes de la solution de chlorure ferrique FeCl <sub>3</sub> (1 %). La présence des tanins est indiqué par une coloration verdâtre (vert-brun) Tanins cathéchiqes ou bleu-noirâtre Tanins galliques. ( <b>Treaset al., 1987 ; Douhouet al., 2003</b> ). |
|                       | <b>Stéroïdes</b>             | on introduit 5 ml d'anhydride acétique et 5 ml de l'extrait dans un bécher, qui sont repris dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive ( <b>Harborne., 1998</b> ).                           |
|                       | <b>Saponosides</b>           | Immergez 2g de poudre de notre plante dans 80ml d'eau distillée pendant quelques minutes, puis filtrez et agitez. L'apparition de mousse persistante dans le milieu prouve la présence de saponines ( <b>Kalla, 2012</b> ).  |
| <b>Chloroformique</b> | <b>Anthraquinones libres</b> | Dans un tube à essai, Introduire 1 ml de la solution extractive avec 1 ml d'Hydroxyded'ammonium(NH <sub>4</sub> OH) puis agiter.<br><br>Une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres ( <b>Diallo, 2000</b> ).  |
|                       | <b>Quinones</b>              | Dans un bécher Mouiller 2g de la poudre avec 2 ml de HCl + 20 ml de chloroforme pendant 3 Heures. Le filtrat a été agité avec 5 ml d'ammoniaque. Une coloration rouge indique la présence des quinones ( <b>Afaq et Malik, 2005</b> ).   |

### 1.2.2.2. Identification des métabolites primaires :

| Métabolites primaires   | Protocole  |
|-------------------------|--|
| <b>Protéines</b>        | Dans un bécher, on introduit 1g de poudre végétale humecté préalablement dans 2ml de NaOH 20%, quelques gouttes de CuSO <sub>4</sub> (2%). La présence des protéines est indiquée par une coloration violette, avec une teinte rougeâtre (Afaq et Malik, 2005).  |
| <b>Lipides<br/>Macé</b> | Une quantité de 10g de la matière végétales (la poudre fine) a été macéré dans 30ml d'éther de pétrole pendant 30 min. La solution obtenue a été filtrée. Le filtrat est ensuite évaporé sur la plaque chauffante. Ajouter 3 gouttes de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> au résidu gras. La présence des lipides est indiquée par une coloration violette (Afaq et Malik, 2005). |

- **Calcul du rendement**

La formule donnée par Harborne, 1998 permet de calculer le rendement d'extraction :

$$R \% = (Me/Mv) \times 100$$

**R %** : Rendement en %.

**Me**:Masse de l'extrait après évaporation du solvant.

**Mv** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

### 1.2.3. Analyse quantitative :

#### 1.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

L'analyse quantitative des polyphénols totaux de deux extraits (éthanolique et méthanolique) est réalisée par le dosage spectrophotométrie selon la méthode du Folin-Ciocalteu (Skerget et al., 2005).

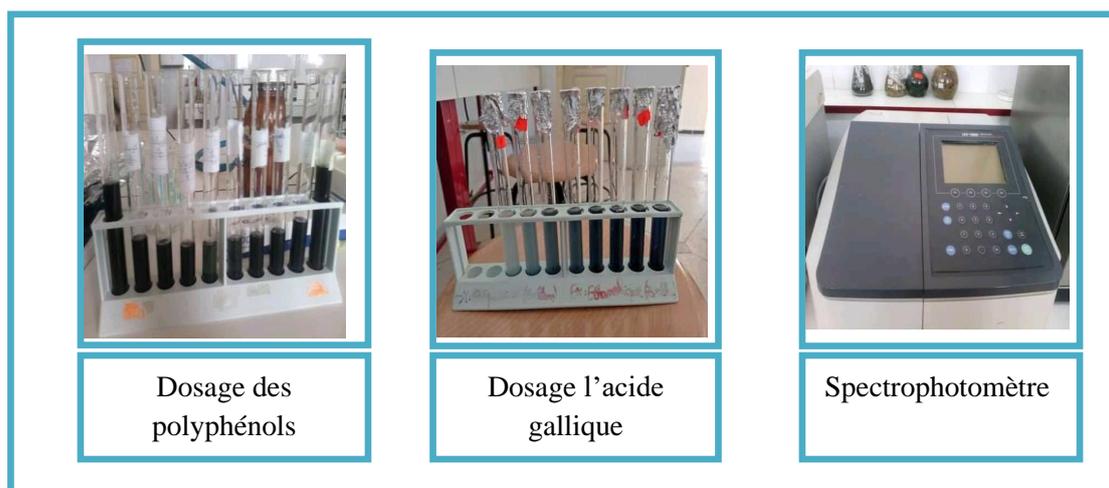
#### A. Principe :

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Le mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm est proportionnelle à la quantité de poly phénols présents dans les extraits végétaux, Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique (**Ribereau-Gayon *et al.* 1982 ; Ribéreau, 1968 ; Boizot et Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005**).

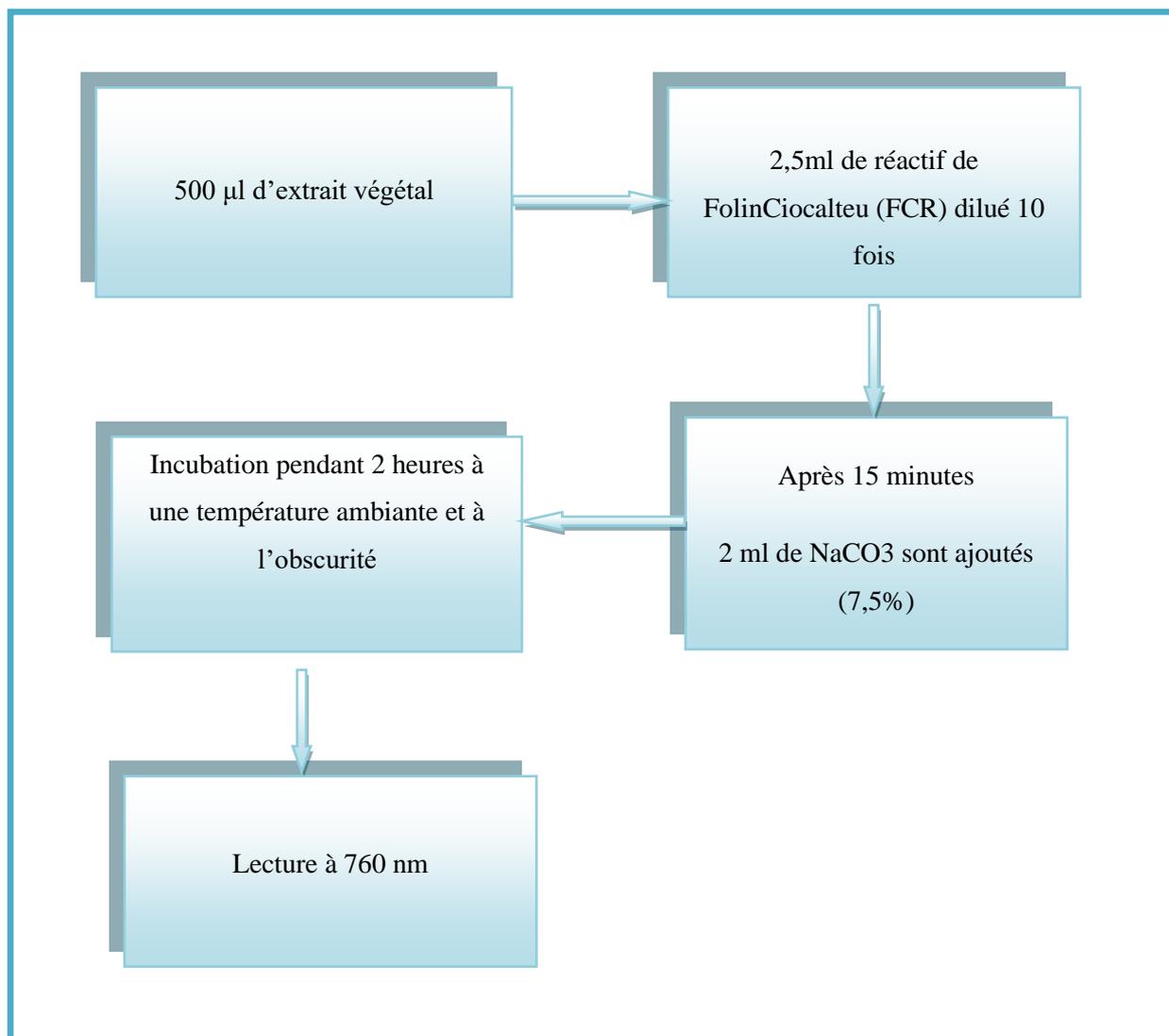
### B. Mode opératoire

Le test de dosage des polyphénols totaux de notre travail a été réalisé au sein de laboratoire pédagogique du Centre Universitaire Abd el Hafid Boussof Mila.

Un volume de 500 µl de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml de réactif de Folin-Ciocalteu(FCR) dilué 10 fois dans de l'eau distillée (1/10) Puis laisser 15 min avant d'ajouter 2 ml de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5 %), agite le mélange à l'aide d'un vortex. L'ensemble a été incubé à une température ambiante pendant 2 heures, et la lecture a été effectuée à 760nm contre un blanc qui constitué le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible. Ce dosage permet de déterminer la concentration en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de concentrations connues d'acide gallique (concentration massique d'acide gallique 0.75 g/l à différentes concentrations (solutions filles)) (**Skerget *et al.*, 2005**).



**Figure 32 :** Matériel de dosage des polyphénols totaux et de l'acide gallique



**Figure 33 :** Protocole de dosage des polyphénols totaux

### 1.2.3.2. Activités biologiques :

#### 1.2.3.2.1. Etude de l'activité anti-oxydante :

##### ❖ Test de DPPH :

##### A. principe :

Le radical 2-2-diphényl 1-picryl-hydrazil (DPPH<sup>•</sup>) est le plus stable radical connu, utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse, qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la CI<sub>50</sub>. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 517 nm. Il est de couleur violette foncée, réduit en présence de composés anti-radicalaires (La forme réduite de couleur jaune) (Molyneux, 2004 ; Bozin *et al.*, 2008).



**2/ Préparations des solutions mères de concentration 5mg /ml :**

Mélanger 0,05g de l'extrait méthanolique avec 10 ml de MeOH absolu dans un tube à essai (Benali et Guenfoud, 2016).

**3 / Préparation des dilutions de l'extrait :**

Les expériences ont été réalisées dans l'ordre décroissance pour 5 concentrations différentes, dilués dans le méthanol (**Tableau 9**)

A partir de chaque solution mère on prépare les dilutions suivantes selon la relation suivante :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

- $C_1$  : Concentration de la solution mère (5mg/ml)
- $V_1$  : Volume de la solution mère (ml)
- $C_2$  : Volume de MeOH ajouté (ml)
- $V_2$  : Concentration final (mg/ml)

**Tableau 09** : Les différentes concentrations des extraits0

| Concentration finale<br>(mg /ml) | V de SM (ml) | V de MEOH (ml) |
|----------------------------------|--------------|----------------|
| 3                                | 3            | 2              |
| 2                                | 2            | 3              |
| 1                                | 1            | 4              |

- On mélange 03 ml de la solution méthanolique du DPPH préparé avec 30  $\mu$ L de l'extrait.
- On laisse à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 15 minutes.
- On mesure l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 517nm.
- Finalement on mesure l'absorbance de chaque concentration par rapport à un blanc constitué uniquement par le méthanol pur (30 $\mu$ L) et le DPPH (3 ml).

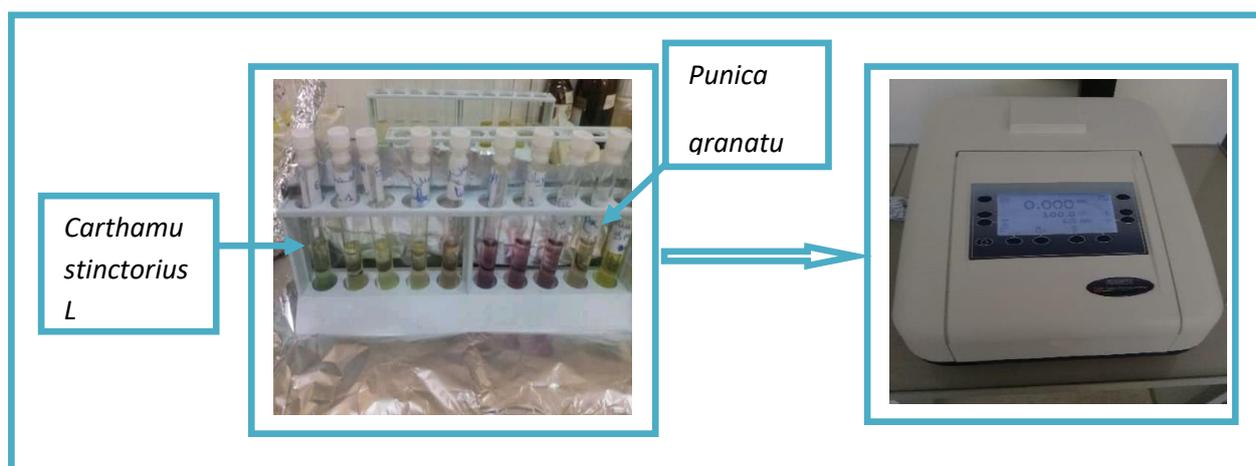
- On trace la courbe de la cinétique de disparition du DPPH en présence de l'échantillon à tester en fonction du temps pour déterminer le temps de stabilisation de la réaction et pour effectuer la lecture de l'absorbance du produit.
- On convertit les mesures d'absorbance en % DPPH restant par la relation suivante :

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$I\% = [(Blanc - \text{extrait}) / Blanc] \times 100$$

- I% : pourcentage d'inhibition.
- Extrait : La densité optique de DPPH en présence de l'extrait à test.
- Blanc : La densité optique de DPPH dans la solution méthanolique.
- On trace la courbe % DPPH restant en fonction de la quantité de l'échantillon antioxydant (en mg /ml)
- On termine par la lecture graphique la quantité d'antioxydant nécessaire pour dégrader 50% de DPPH (**Benali et Guenfoud, 2016**).
- **Calcul des EC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>) :**

Pour chaque extrait, nous avons déterminé la valeur IC<sub>50</sub>, qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire les radicaux DPPH de 50 %. La IC<sub>50</sub> est calculée à partir de l'équation graphique ; basée sur le pourcentage d'inhibition standard utilisé dans les tests et les études d'extrait à différentes concentrations (**Bouras et Houchi, 2013**).

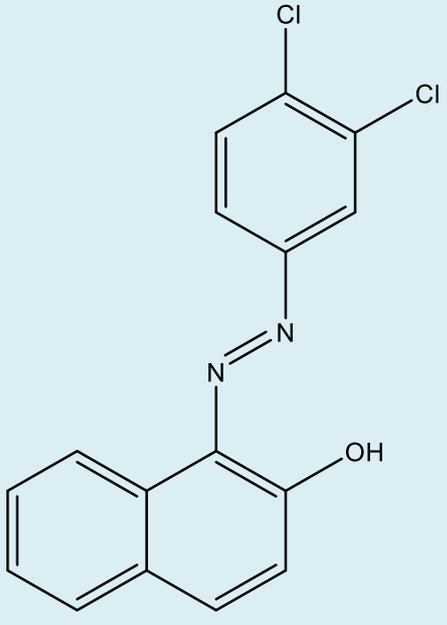


**Figure 36 :** Préparation de l'extrait (*Punica granatum* L. et le *carthamus tinctorius* L.).

## ❖ Préparation de solution méthanolique de colorant synthétique :

Nous avons utilisé ce colorant synthétique pour étudier leur activité antibactérienne et antioxydant et comparée les effets de colorant synthétique avec des colorants naturels (**Tableau 10**). Ce colorant a été recristallisé dans du THF /H<sub>2</sub>O (1V/1V) après évaporation lente à température ambiante pendant plusieurs jours et lavé à l'eau distillée (**Bougueria H et al., 2013**).

**Tableau 10** : Nomenclature, formule et structure chimique de colorant synthétiques (**Bougueria H et al., 2013**).

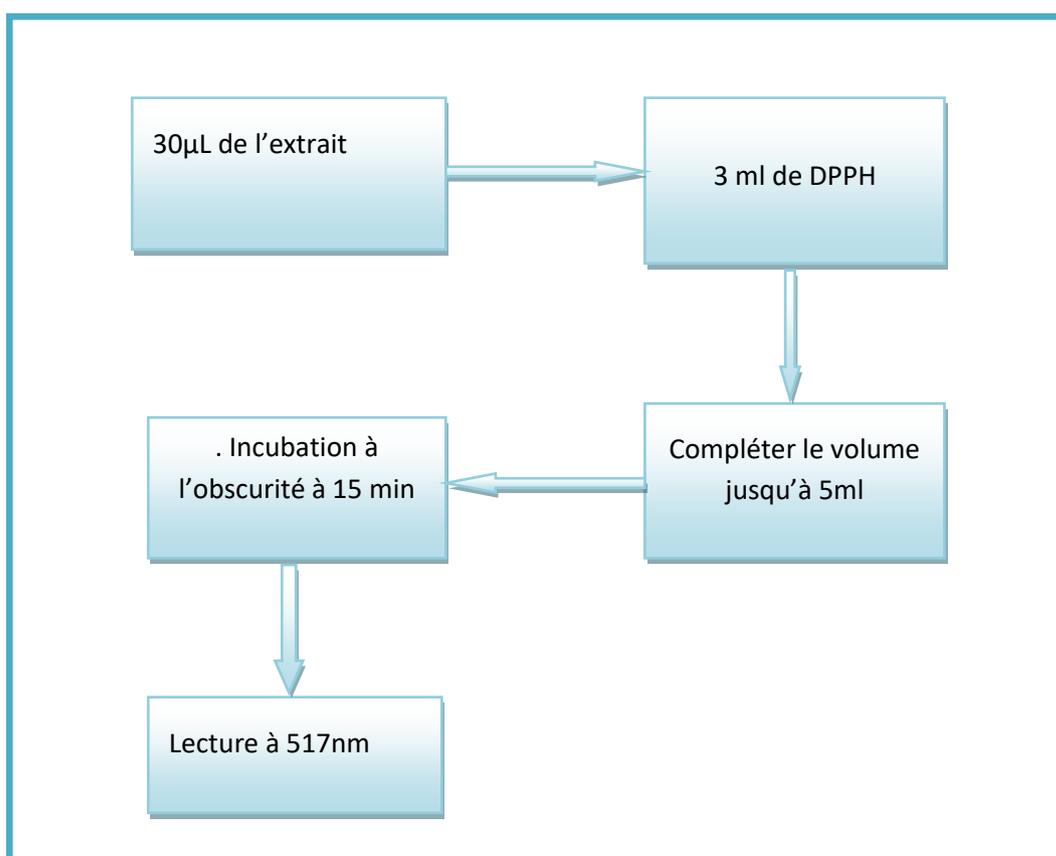
| Colorant   | Nomenclature                      | Formule  | Structure chimique  |
|------------|-----------------------------------|--|---|
| Colorant 1 | 1-(3,4-chlorophenylazo)-2-naphtol | C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O |  |

## ❖ Mode opératoire :

- 1- Dans un tube à essai, Introduire une quantité de 0,0016 g de la poudre du colorant 1-(3,4-chlorophenylazo)-2-naphtol, a été dissous dans 5ml de méthanol (**figure 37**).
- 2- Dans le deuxième tube et à l'aide d'une micropipette on prend 100 µl de la solution déjà préparé (premier tube) puis on ajoute 5ml de méthanol. L'absorbance du colorant est ensuite lue par un spectrophotomètre UV/visible.



**Figure 37 :** Préparation de colorant 1-(3,4-chlorophenylazo)-2- naphtol.



**Figure 38 :** Protocole d'évaluation de l'activité anti-oxydante.

### 1.2.3.2.2. Etude de l'activité anti bactérienne :

L'activité antibactérienne *in vitro* de *Crathamus tinctorius L* et de la *Punica granatumL*, contre différents souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spizizenii* et *Staphylococcus aureusa* été réalisée par la méthode de diffusion (Bolou et al., 2011), dans le laboratoire pédagogique du centre universitaire Mila.

#### A) Le principe de la méthode :

Le principe de la méthode repose sur la diffusion d'un composé à effet antibactérien en milieu solide dans une boite de pétri, qui est appréciée par la mesure de son activité antibactérienne contre la cible après un certaine durée de contact du produit avec le microorganisme cible. Zone d'inhibition, en fonction du diamètre de la zone d'inhibition. (Cavallo, 2007).

#### B) Matériel du test de l'activité antibactérienne :

Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne doivent être réalisés dans des conditions stériles strictes. En pratique, le matériel, les solutions et les milieux de cultures doivent être stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

#### C) Milieux des cultures :

Les milieux utilisés pour réalisés le test antibactérien sont les suivant :

- Boillon nutritif pour vérifier la viabilité des bactéries.
- Gélose nutritive est utilisée pour l'isolement et la conservation des souches, c'est un milieu suffisant pour la plupart des bactéries.
- La gélose Mueller Hinton est utilisée pour tester la sensibilité des bactéries à différents extraits végétaux.

#### D) Les souches bactériennes :

Quatre souches bactériennes ont été testées: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spizizenii* et *Staphylococcus aureus*. (Tableau 11).

**Tableau 11** : Liste des souches bactériennes étudiées.

| Genre et espèce         | Gram    | Famille                   | Référence |
|-------------------------|---------|---------------------------|-----------|
| <i>Escherichia coli</i> | Négatif | <i>Enterobacteriaceae</i> | ATCC8739  |
| <i>Pseudomonas</i>      | Négatif | <i>Pseudomonadaceae</i>   | ATCC9027  |

|                              |         |                          |          |
|------------------------------|---------|--------------------------|----------|
| <i>aeruginosa</i>            |         |                          |          |
| <i>Bacillus spizizenii</i>   | Positif | <i>Bacillaceae</i>       | ATCC663  |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | <i>Staphylococcaceae</i> | ATCC6538 |

#### E) Préparation des disques :

Des disques de papier Whatman N° 3, de 6 mm de diamètre, ont été stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, puis scellés et stockés dans des tubes en verre stériles jusqu'à utilisation.

#### F) Préparation des précultures :

Suspendre la souche à tester dans un bouillon nutritif et la faire croître à 37°C pour vérifier sa viabilité. Après 24h, la suspension a été inoculée au goutte-à-goutte sur un gel nutritif puis incubée dans une étuve à 37°C pendant 24h

#### G) Préparation de l'inoculum :

Après l'incubation, remettre en suspension les colonies bien isolées dans une solution saline (0,9% de NaCl) (l'eau physiologique), pour obtenir une optique de 0,08 à 0,1 à 625 nm (**Gulluce et al., 2006**).

#### H) Mode opératoire :

- 1- Verser la gélose de Mueller Hinton dans des boîtes de pétri, et après refroidissement et solidification sur la paillasse, utiliser un râteau pour étaler 100µl de chaque suspension bactérienne préparée à partir de jeunes cultures à la surface du milieu gélosé.
- 2- Préparation des dilutions : L'extrait méthanolique de *Crathamus tinctorius* L. et de *Punica granatum* L. et aussi le colorant synthétique sont dilués avec le diméthyl sulfoxyde (DMSO) dans des tubes eppendorfs. Les concentrations des extraits sont réalisées selon les méthodes suivantes :
  - Solution mère (SM) : 100 mg de l'extrait méthanolique dans 1ml de DMSO (100%)
  - T½: 0,5ml d'extrait de SM avec 0.5ml de DMSO (50%).
  - T¼: 0.5ml d'extrait de T½ avec 0.5ml de DMSO (25%).

- T<sup>1/8</sup> : 0.5ml d'extrait de T<sup>1/4</sup> avec 0.5ml de DMSO (12.5%).
- 3- Un disque d'environ 6mm a été prélevé à la pince stérile puis imprégné avec 10 µl de différentes concentrations de 100 mg/ml ; 50mg/ml ; 25mg/ml ; 12,5mg/ml. Placer ensuite dans des boîtes de pétrie, une fois appliqué, les disques ne doivent pas être placés. Dans chaque boîte de pétri, placer un disque imbibé de 10µl de DMSO comme un contrôle (témoin) négatif. Incuber tous les plats dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. (Murray et al., 1995, Gulluce et al, 2006).

#### I) Lecture

Après l'incubation, l'effet de l'extrait s'est traduit par l'apparition d'une zone circulaire transparente autour du disque, correspondant à une absence de la croissance. (Najjaa et al., 2007).

Les résultats sont lus en mesurant la zone d'inhibition (à l'aide d'une règle (mm) à l'extérieure de la boîte). Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus elle est sensible à la déformation (Tableau 12) (Choi et al., 2006).

**Tableau 12 :** Évaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition. (Choi et al., 2006).

| Observation          | Signe | Diamètre d'inhibition |
|----------------------|-------|-----------------------|
| Non sensible         | (-)   | <8 mm                 |
| Sensible             | (+)   | 8 à 14 mm             |
| Très sensible        | (++)  | 15 à 20 mm            |
| Extrêmement sensible | (+++) | >20 mm                |

# *Chapitre II*

## *Résultats et discussions*



## 1. Analyse qualitative (Screening phytochimique) :

### ❖ Résultats et discussion :

L'authenticité d'une espèce végétale donnée est un paramètre important à considérer (Lewis, Ausubel, 2006), et doit être déterminée avant d'envisager toute évaluation biologique ou l'utilisation d'un extrait de plante pour des applications médicales ou pharmaceutiques. Plusieurs attributs génétiques ainsi qu'environnementaux peuvent affecter le profil de ces composés phytochimiques d'un extrait végétal donné, influençant ainsi son activité biologique (Lewis, Ausubel, 2006). Cette observation doit également s'appliquer à l'extraction, les conditions d'extraction et plus spécifiquement le choix du solvant utilisé pour l'extraction, car ils ont un effet sur le profil phytochimique de ces extraits (Jayaweera, 1980).

La caractérisation phytochimique de ces extraits de plantes est importante afin d'obtenir des résultats conformes à la réalité et importante pour obtenir des résultats reproductibles, mais sa composition est souvent perturbée par le choix de la méthode d'analyse due au choix de la méthode analytique (HPLC, absorption UV-visible, GC-MS ou avec d'autres détecteurs) et donc de sa résolution (Tzeng, et al., 2015). L'identification des composés bioactifs est importante, mais aussi un défi dans la mesure où l'activité phytochimique observée pourrait être le résultat d'une synergie complexe entre différents composés provenant de différents extraits, ce qui est un défi lors du processus d'identification (Shah, 2012).

La détermination biologique *in vitro* doit être effectuée pour permettre l'évaluation simultanée de différents extraits de plantes avant leur évaluation sur des modèles animaux de laboratoire, et également avant d'effectuer une évaluation complète de la toxicité, des études épidémiologiques ou même des essais cliniques (Sandhya, et al., 2010).

Lors de nos études expérimentales au laboratoire nous avons bien sûr observé des changements de couleur des extraits ou la formation des précipités, pour cela le tableau suivant résume toutes les substances actives détectées.

Tableau 13 : Résultats d'analyse phytochimique des métabolites primaires et secondaires.

| Métabolites             | L'extrait       | Test phytochimique         | Résultat                  |                                |
|-------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------|
|                         |                 |                            | <i>Punica granatum</i> L. | <i>Carthamus tinctorius</i> L. |
| Métabolites primaires   | Poudre végétale | Test des protéines         | ±                         | –                              |
|                         |                 | Test des lipides           | –                         | –                              |
| Métabolites secondaires | éthanolique     | Test des flavonoïdes       | +++                       | ++                             |
|                         |                 | Test des alcaloïdes        | ++                        | ++                             |
|                         |                 | Test des stérols           | +                         | –                              |
|                         |                 | Test des coumarines        | +++                       | –                              |
|                         |                 | Test des glycosides        | ++                        | ++                             |
|                         | Aqueux          | Test des saponosides       | -                         | ±                              |
|                         |                 | Test des tanins            | +++gallique               | +++catechique                  |
|                         |                 | Test des stéroïdes         | ±                         | –                              |
|                         | Chloroformique  | Test Anthraquinones libres | –                         | –                              |
|                         |                 | Test des quinones          | –                         | –                              |

+++ = importante quantité ; ++ = petite quantité ; ± = Trace ; - = absence

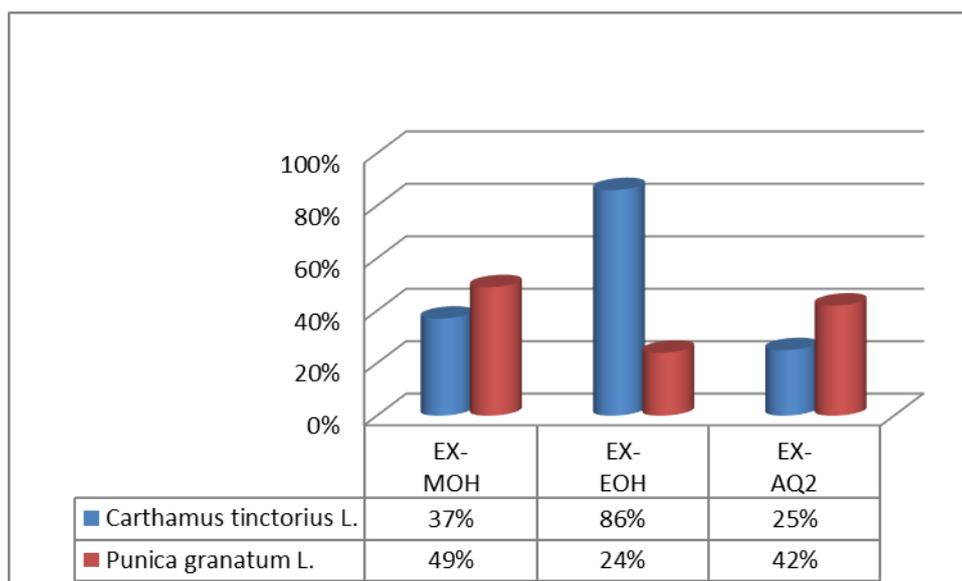
Les résultats de l'analyse phytochimique effectuée sur les différents extraits : éthanolique, aqueux, et Chloroformique de *Punica granatum* L. ont montré la présence de plusieurs composés bioactifs : tanins, glycosides, coumarines, alcaloïdes et flavonoïdes et quelques traces des stérols, stéroïdes et protéines. Alors que les saponosides, les quinones, les anthraquinones, et les lipides sont absents, Ces résultats est prouches avec ceux de **Kaci-meziane et al., 2017 ; Kesur et al.,2016 ; Chebaibi et Filali,2013 ;Sajjad et al.,2015 ; Bhandary et al., 2012 ; Deore Leena et al., 2016 ; Ozcal et Dinc, 1993 ; Lansky et al., 2007 ; Moualkia, Gourmati, 2015.** Qui a révélé la présence de tanins, alcaloïdes, les coumarines, et flavonoïdes, et aussi l'absence des saponosides. (La richesse de *Punica granatum* L ,en ces grands groupes de composés chimiques actifs pourrait alors justifier l'utilisation traditionnelle de cette plante pour la médecine, et les produits de beauté).

Concernant la plante *Carthamus tinctorius* L, Les résultats du criblage phytochimique montrent une forte présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, les saponines, les glycosides, et les tanins et une présence en quantité minime, des saponines. Tandis que les tests de stérols, stéroïdes, coumarines, anthraquinones libres, les quinones, les protéines et les lipides sont négatifs. ce résultat est en accord avec celui obtenus par **Taka hoshi et al., 1982 ; He et al., 2014 ; Ghdadba et al.,2015** qui a noté une présence des flavonoïdes, des glycosides, des tanins, et des alcaloïdes

- ✓ Les compositions chimiques des deux plantes se différent d'une étude à l'autre. Cette différenciation du cultivar, des pratiques culturales, du stade de maturation, des conditions pédoclimatiques, et de la zone de culture.

## 2. Rendement en extraits bruts :

Les rendements d'extraction de la *Carthamus tinctorius* L.et *Punica granatum* L. sont représentés par la figure (39).



**Figure 39 :** Rendement des extraits bruts.

Les résultats montrent que l'extrait éthanolique de *Carthamus tinctorius* L. a donné le meilleur rendement d'extraction (86 %), suivi par l'extrait Méthanolique entier (37%) et (25%) pour l'aqueux. Contrairement pour le *Punica granatum* L, nous remarquons que le rendement le plus élevé a été observé dans l'extrait méthanolique (49%), par rapport à l'extrait aqueux (42%) et l'extrait éthanolique qui est moins élevé (24%).

D'après les résultats obtenus ; on remarque que le rendement est élevés à celui de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* L, il est de **49 %** par rapport au rendement de **Iqbal et al, 2008 ; Kanoun et al, 2014 ; Maliviya et al, 2014 ; Sultana et al. 2008.** qui a enregistré une valeur de 33,9%, 37%, 16,3%, 29,9% respectivement. et faible à celui de l'extrait éthanolique de *Punica granatum* L, il est de **24 %** par rapport au rendement de **Kaci-meziane et al., 2017** il est de **31.2%-36%**.

Pour le *Carthamus tinctorius* L. étudié dans ce travail nos résultats sont considérés comme premières de ce genre, parce que le rendement en extraits bruts de cette plante n'a jamais fait l'objet d'une publication.

Le rendement d'extraction de deux plantes sont défèrent car ce dernier n'est que relatif et semble être lié à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte, et les propriétés génétique de la plante.

Le rendement dépend de plusieurs paramètres tels que les conditions de séchage de la plante, le broyage, la polarité des solvants et la nature des composés à extraire, le temps d'extraction et la qualité de solvant, la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été réalisée (**Bourgou, 2016**).

### 3. Analyse quantitative :

#### 3.1. Dosage des polyphénols totaux :

La teneur en polyphénols totaux des différents extraits obtenus à partir des deux plantes, a été estimée par des dosages spectrophotométriques, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

La courbe d'étalonnage a été réalisée à l'aide de différentes valeurs des concentrations de l'acide gallique, et leurs absorbances correspondantes. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage ( $Y = 0,004X$ ) et le coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,996$ ) et exprimée en milligramme équivalent en acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

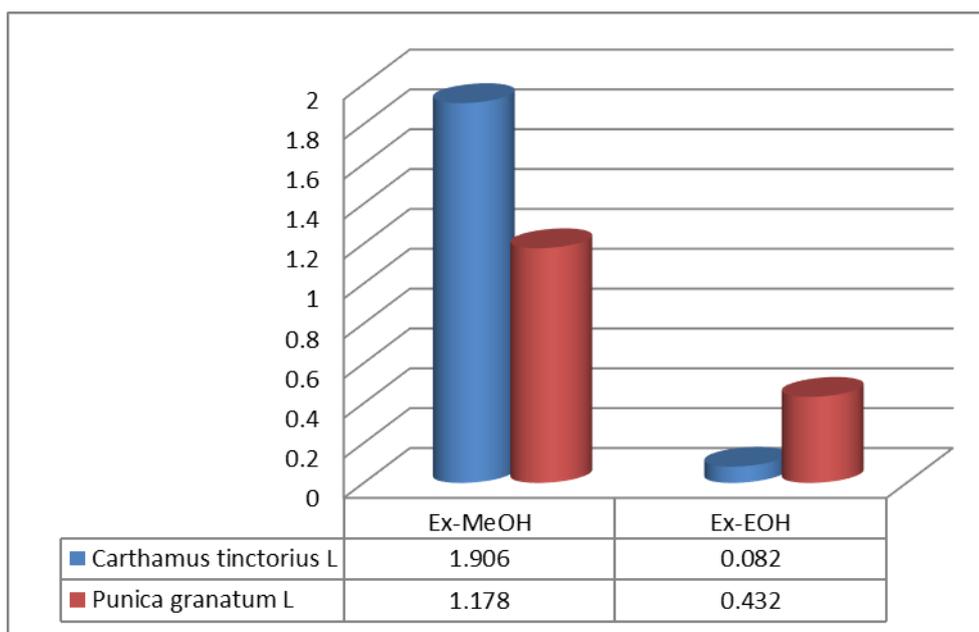
##### ➤ Extrait méthanolique :

La dilution 1/32 de l'extrait du *Punica granatum* L. et *Carthamus tinctorius* L. ont enregistré une teneur en polyphénols avec une valeur moyenne de **1,178 ± 3,77 mg EAG/g** et **1,906 ± 18,85 mg EAG/g** respectivement ce qui indique que ces plantes sont riches en polyphénols.

##### ➤ Extrait éthanolique :

1/La dilution 1/2 de l'extrait du *Punica granatum* L. a enregistré une teneur en polyphénols avec une valeur moyenne de **0,432 ± 0,23 mg EAG/g** ; ce qui montre que cette dernière contient une quantité moyenne de polyphénol.

2/La dilution 1/2 de l'extrait du *Carthamus tinctorius* L. a enregistré une teneur en polyphénols avec une valeur moyenne de **0,082 ± 0,40 mg EAG/g** ; ce qui montre que cette dernière est presque pauvre en polyphénol.



**Figure 40 :** Teneurs des polyphénols totaux des extraits.

Pour l'extrait méthanolique de *Punica granatum* L. ; Nos résultats de la teneur en polyphénols est (**1,178 mg EAG/g**) inférieur au résultat de **Ben Nasr et al.,1996 ; Malviya et al.,2014 ; Bendjabeur.2012** qui a une valeur de **80mg EAG/g, 216.9 mg EAG/g, et 423,5 mg EAG/g** respectivement. Même chose pour l'extrait éthanolique de *Carthamus tinctorius* L. Nos résultats de la teneur en polyphénols est (**0,082 mg EAG/g**) faible par rapport à la teneur en polyphénols de **Rabie Kachkoul et al., 2020** qui a une valeur de **109.44 ± 1.37mg EAG/g**.

Pour l'extrait méthanolique les résultats de cette étude confirment des études antérieures montrant que les polyphénols, en fonction de leur concentration, peuvent avoir un effet biologique. A de faibles concentrations, les polyphénols peuvent agir comme des antioxydants en agissant comme piègeurs de radicaux ou par d'autres mécanismes. Au contraire à des concentrations plus élevées (**Halliwell, 2008**)

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extractions réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques tels que des facteurs géographiques, climatiques et les facteurs génétiques, mais aussi le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur la teneur en polyphénols (**Fiorucci, 2006**), elle dépend donc de plusieurs paramètres tels que les conditions de méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (**Bourgou, 2016**).

#### 4. Activités biologiques :

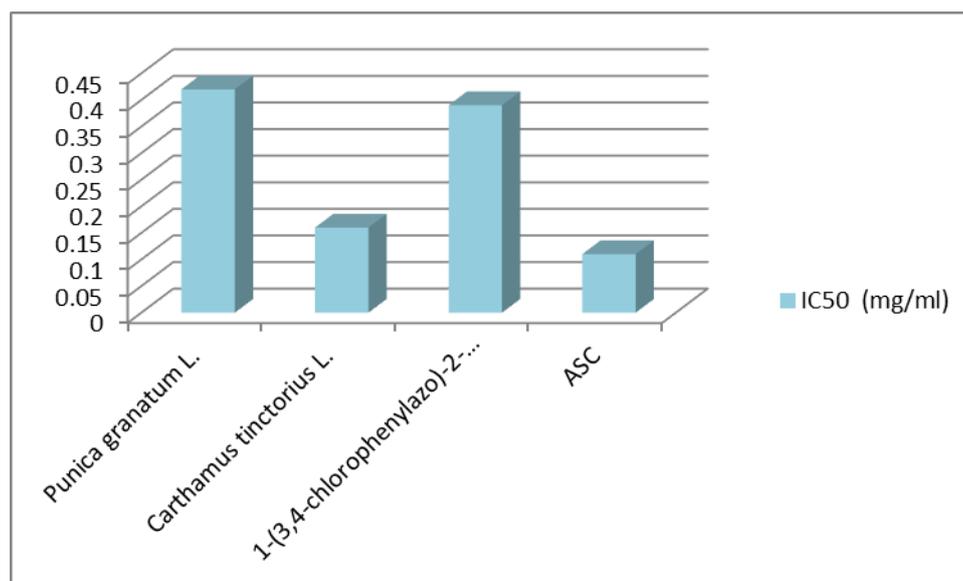
##### 4.1. L'activité antioxydante :

L'activité anti radicalaire de *Carthamus tinctorius* L., *Punica granatum* L. et le colorant 1-(3,4-chlorophenylazo)-2-naphtol est mesurée par la méthode du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), cette méthode est fréquemment utilisée pour sa simplicité dans le but de déterminer la concentration de l'antioxydant permettant d'inhiber la moitié du radical (50% du radical). Le paramètre IC<sub>50</sub> est une valeur exprimant la concentration de l'extrait nécessaire pour diminuer l'absorbance du DPPH de 50% (inhibition de DPPH à 50%), il est déterminé graphiquement à partir des droites représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait. L'efficacité est estimée à partir de l'activité de l'acide ascorbique comme référence standard.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de cet extrait et du standard a été effectuée avec trois dilutions.

**Tableau 14 :** IC<sub>50</sub> et inhibitions maximales des extraits déterminés par la méthode de DPPH.

| L'extrait<br>méthanolique                 | IC <sub>50</sub> (mg/ml) | % Inhibition<br>maximale |
|---|--------------------------|--------------------------|
| <i>Punica granatum</i> L.                 | 0,42±0.04                | 83,24±0,93               |
| <i>Carthamus tinctorius</i><br>L.         | 0,16±0.08                | 84,45±1,98               |
| 1-(3,4-<br>chlorophenylazo)-2-<br>naphtol | 0.39±0,26                | 81,2±0,06                |
| ASC                                       | 0.11±0.02                | 80,12±0,33               |



**Figure 41** : IC<sub>50</sub> des différents extraits.

Selon les résultats obtenus dans le tableau et la figure ci-dessus, on remarque que l'extrait méthanolique des espèces étudiées et le colorant 1-(3,4-chlorophenylazo)-2-naphtol présente une faible activité antioxydante par rapport à celle du standard (ASC). L'acide ascorbique enregistre une activité antioxydante plus importante avec la valeur d'IC<sub>50</sub> de **0.11 mg/ml** alors que l'extrait d'*Punica granatum* L., d'*Carthamus tinctorius* L. et le colorant synthétique possèdent une faible activité anti-radicalaire avec des valeurs des IC<sub>50</sub> égales à **0.42 mg/ml**, **0.16 mg/ml**, et **0.39±0,26** respectivement.

La valeur d'IC<sub>50</sub> est liée à la capacité antioxydante d'un composé, plus l'IC<sub>50</sub> est faible plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée et vice versa (Villaño et al., 2007). Les résultats montrent que l'activité antioxydante de *Carthamus tinctorius* L. est supérieure à celle du colorant et du *Punica granatum* L.

Pour le *Punica granatum* L. Les travaux de Bakhtaoui., 2019 ; Moualkai et Gourmati., 2015 présentent des valeurs d'IC<sub>50</sub> d'extrait méthanolique de **0.68 mg/ml**, et **747.02 µg/ml** respectivement, ce résultat est révélé supérieur à celui obtenu dans notre étude. Mais les travaux de kulkarniet al., 2004 ; Bendjabeur, 2012 ; Zatoun et Ghanem . 2017) présentent des valeurs d'IC<sub>50</sub> de **8.33 µg/ml**, **5.49 µg/ml**, **0.0069 mg/ml** respectivement, Ce résultat est révélé inférieur à celui obtenu dans notre étude.

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'IC<sub>50</sub> de *Carthamus tinctorius* L. est plus important, qui est de (IC<sub>50</sub>=**0,16 mg/ml**), et supérieur aux résultats de Tiziana Bacchetti et al., 2020, qui est de (IC<sub>50</sub>=**13.4±1.0 µg/ml**)

Une relation entre l'activité antioxydant et les caractéristiques structurelles des polyphénols a été rapportée par plusieurs auteurs (Heim et al., 2002). Les données de la littérature indiquent que l'activité antioxydant des composés phénoliques est directement associée à la présence de groupes hydroxyle (Heim et al., 2002).

Les flavonoïdes sont bien connus pour leurs diverses activités biologique notamment leurs activités antioxydant (Li et al., 2015b, Ye et al., 2014). Ainsi, des études sur l'activité se sont principalement concentrée sur les flavonoïdes (Rabak et Gryglewski, 1988 ; Yuting et al., 1990 ; Lee et al., 2002).

Pour le colorant synthétique étudié dans ce travail nos résultats sont considérés comme premières de ce genre, parce que l'étude de l'activité antioxydant de ce colorant n'a jamais été publiée.

**4.2. L'activité antibactérienne :**

**4.2.1. Résultat :**

(-) : Non sensible ; (+) : Sensible ; (++) : Très sensible ; (+++) : Extrêmement sensible

**4.2.1.1. Extrait méthanologique :**

**Tableau 15 :** Activité antibactérienne des différentes extractions méthanologique contre les souches bactériennes testées.

| Extrait méthanologique         | Souche bactérienne            | Diamètres d' inhibition en mm | Concentration de plante pour l'extrait éthanologique en (mg/ml) |          |          |            |           |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|----------|----------|------------|-----------|
|                                |                               |                               | SM  | C1       | C2       | C3         | DMS O     |
|                                |                               |                               | 100 mg/ml   | 50 mg/ml | 25 mg/ml | 12,5 mg/ml | 100 mg/ml |
| <i>Punica granatum L.</i>      | <i>E. coli</i>                |                               | 7,5   | 7        | -        | -          | -         |
|                                |                               |                               | 7,5   | 7        | -        | -          | -         |
|                                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |                               | 7   | -        | -        | -          | -         |
|                                |                               |                               | 7   | -        | -        | -          | -         |
|                                | <i>Bacillus spizizenii</i>    |                               | 11  | 10,5     | 9,5      | 8,5        | -         |
|                                |                               |                               | 11  | 10       | 9        | 8,5        | -         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   |                               | 10                            | 9   | 8,5      | 8,5      | -          |           |
|                                |                               | 9                             | 8,5   | 8        | 7        | -          |           |
| <i>Carthamus tinctorius L.</i> | <i>E. coli</i>                |                               | 14  | 12       | 10       | 8          | -         |

|  |                               |  |    |    |    |     |   |
|--|-------------------------------|--|----|----|----|-----|---|
|  |                               |  | 14 | 12 | 10 | 8   | - |
|  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |  | 22 | 20 | 18 | 18  | - |
|  |                               |  | 18 | 17 | 14 | 12  | - |
|  | <i>Bacillus spizizenii</i>    |  | 22 | 17 | 11 | 9   | - |
|  |                               |  | 23 | 10 | 10 | 8   | - |
|  | <i>Staphylococcus aureus</i>  |  | 21 | 17 | 13 | 9,5 | - |
|  |                               |  | 20 | 15 | 13 | 10  | - |

#### 4.2.1.2. Extrait éthanolique :

L'extrait éthanolique de chacune de deux espèces n'a aucun effet à l'encontre des souches bactériennes testées. On remarque aussi l'absence de pouvoir inhibiteur du témoin négative (DMSO).

#### 4.2.1.3. Résultats de l'activité antibactérienne de colorant synthétique (azoïques) :

Selon les résultats enregistrés (Tableau 15), nous ne soulignons que Le 1-(3,4-chlorophenylazo)-2-naphthol ne présente aucun effet sur les bactéries testées. L'effet des différentes dilutions du colorant synthétique vis-à-vis les souches testées est représenté dans la **figure 46**.

**Tableau 16 :** Résultats de l'activité antibactérienne d'extrait de colorant.

| Souche bactérienne            | Concentration de plante pour l'extrait éthanolique en (mg/ml) |          |          |            |           |
|-------------------------------|---|----------|----------|------------|-----------|
|                               | SM  | C1       | C2       | C3         | DMSO      |
|                               | 100 mg/ml   | 50 mg/ml | 25 mg/ml | 12,5 mg/ml | 100 mg/ml |
| <i>E. coli</i>                | -   | -        | -        | -          | -         |
|                               | -   | -        | -        | -          | -         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -        | -        | -          | -         |
|                               | -   | -        | -        | -          | -         |
| <i>Bacillus spizizenii</i>    | -   | -        | -        | -          | -         |
|                               | -   | -        | -        | -          | -         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | -   | -        | -        | -          | -         |
|                               | -   | -        | -        | -          | -         |

4.2.2. Evaluation de l'activité antibacterienne :

4.2.2.1. Les colorants naturels :

a. *Punica granatum* L.

✓ Extrait méthanolique :

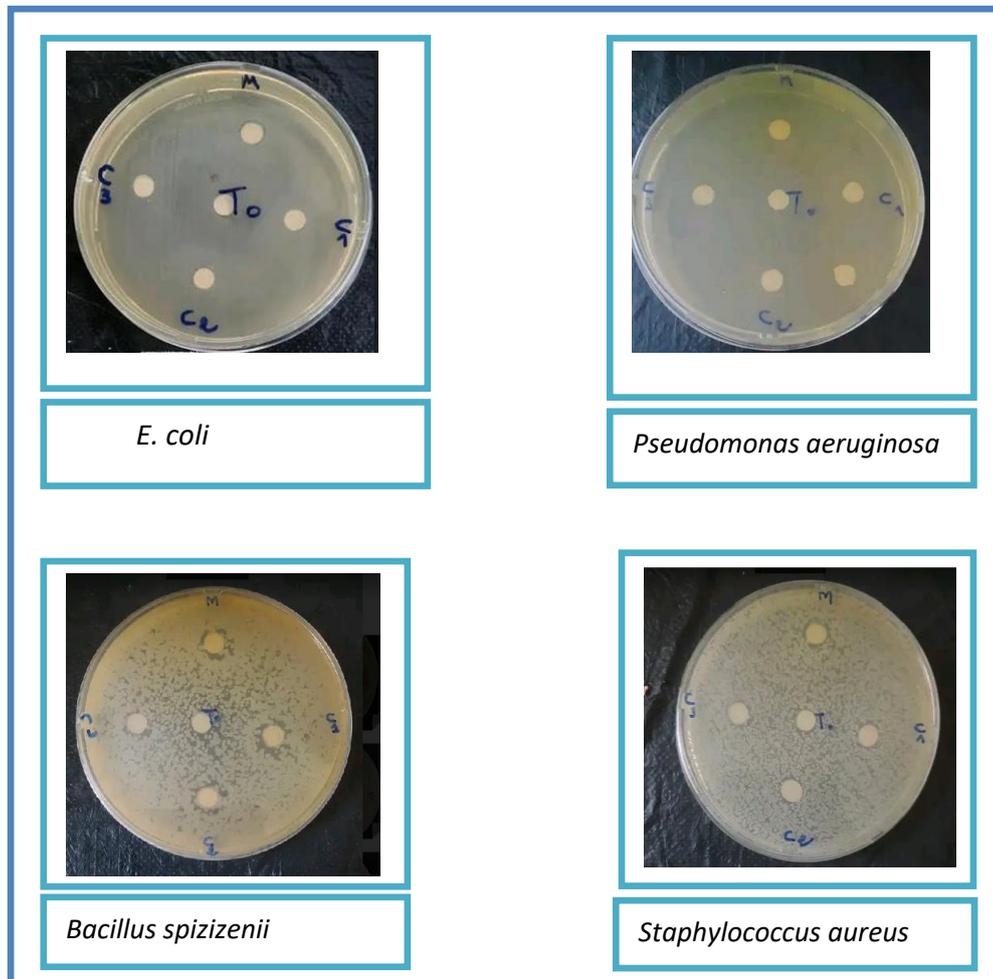
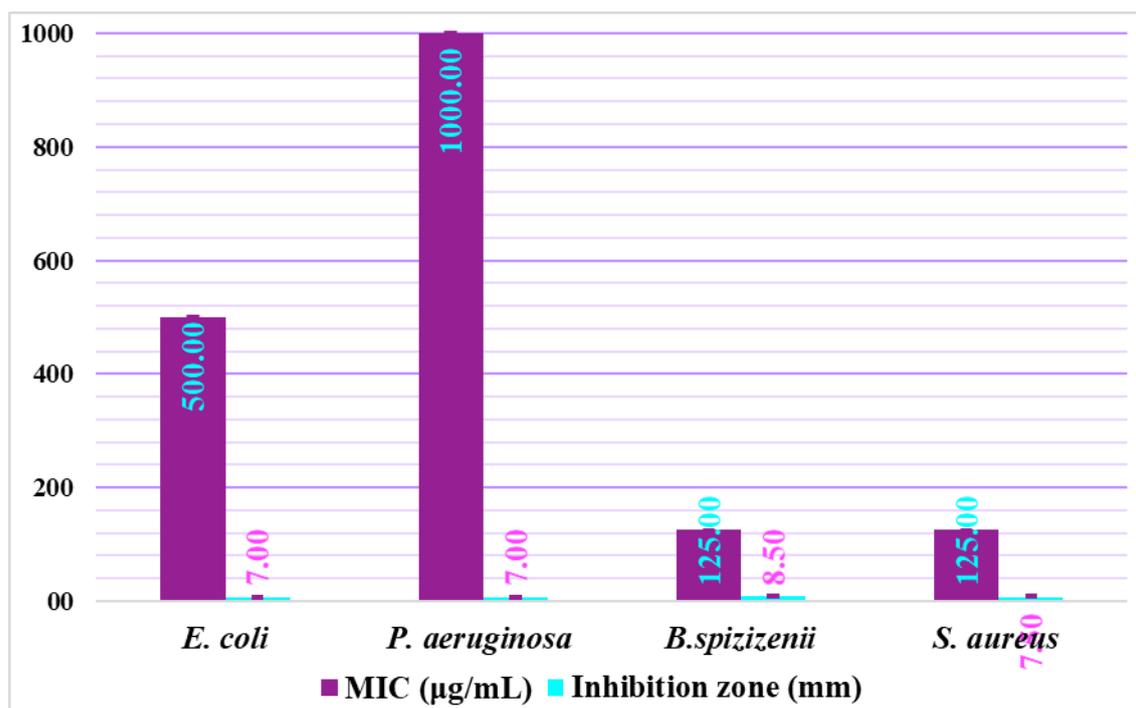


Figure 42 : Effet de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* L. sur les bactéries étudiées.



**Figure 43 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) de *Punica granatum* L. sur les différentes souches dans différentes concentrations.

#### b- *Carthamus tinctorius* L.

##### ✓ Extrait méthanolique :

Les résultats de l'activité antibactérienne in vitro ont été obtenus en utilisant la méthode de diffusion sur gélose, les résultats ont montré de l'extrait méthanolique a une activité antibactérienne important souches d'étude .En fait ,l'activité la plus intense de *Pseudomonas aeruginosa* un diamètre d'inhibition de 15mm Suivi par des bactéries *Staphylococcus aureus* d'inhibition de 15mm Suivi par des bactéries *Staphylococcus aureus* 9.75 mm, suivi par des bactéries *Bacillus spizizenii* avec un diamètre d'inhibition de 8.5mm, finalement , l'activité la plus faible du *E. coli* été enregistrée avec un diamètre d'inhibition de 8mm.

Selon (Hayoni et al., 2007) la résistance des quatre souches bactériennes peut être attribuées à la capacité de l'agent antibactériens de diffuser dans l'agar, L'hypersensibilité des quatre souches aureus peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des Bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de membrane externe.

Il été prouvé que les polyphénol, tels que les flavonoïdes comme la catéchique (Shan et al., 2007) sont des substances antibactériennes importantes.

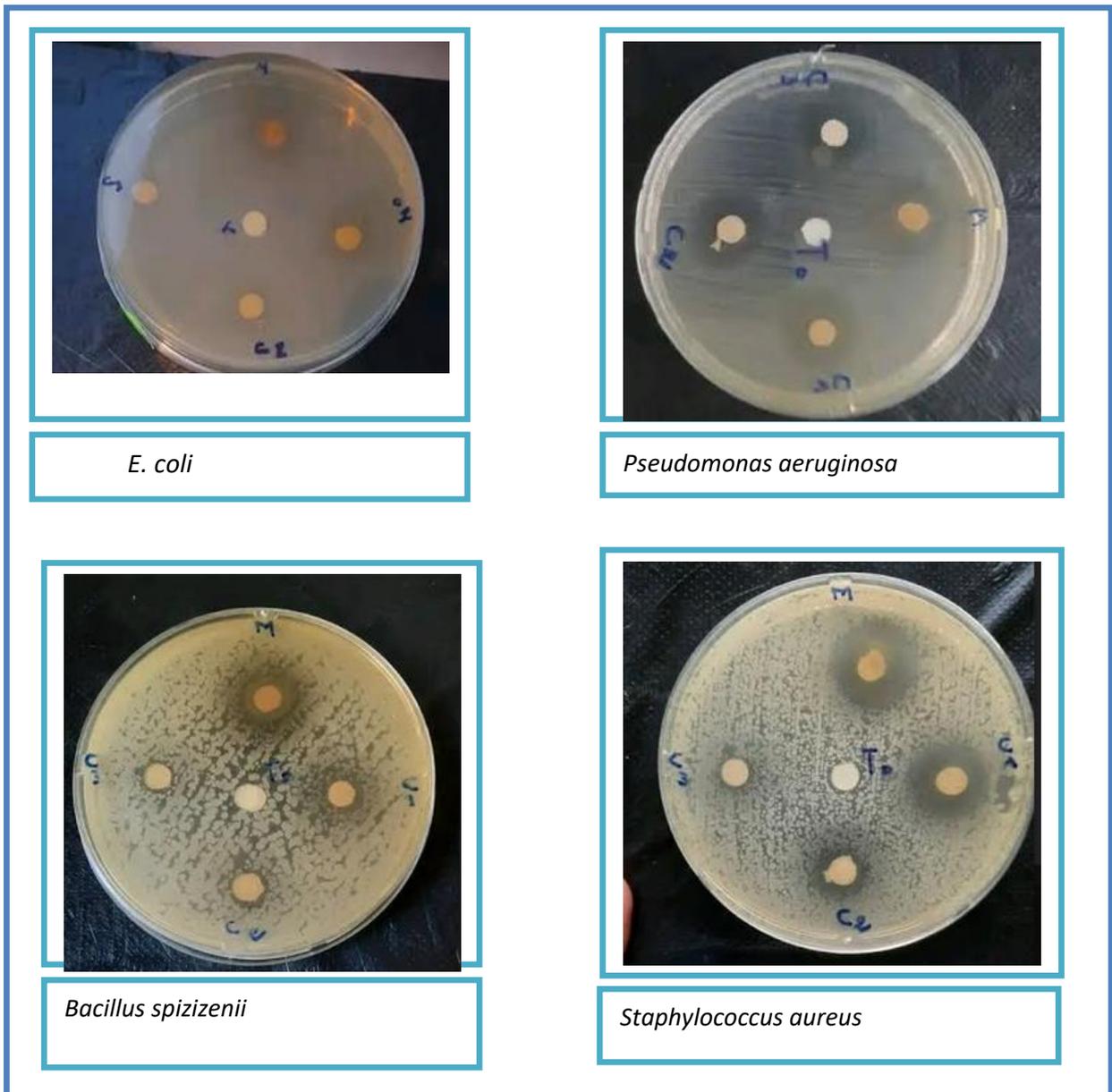
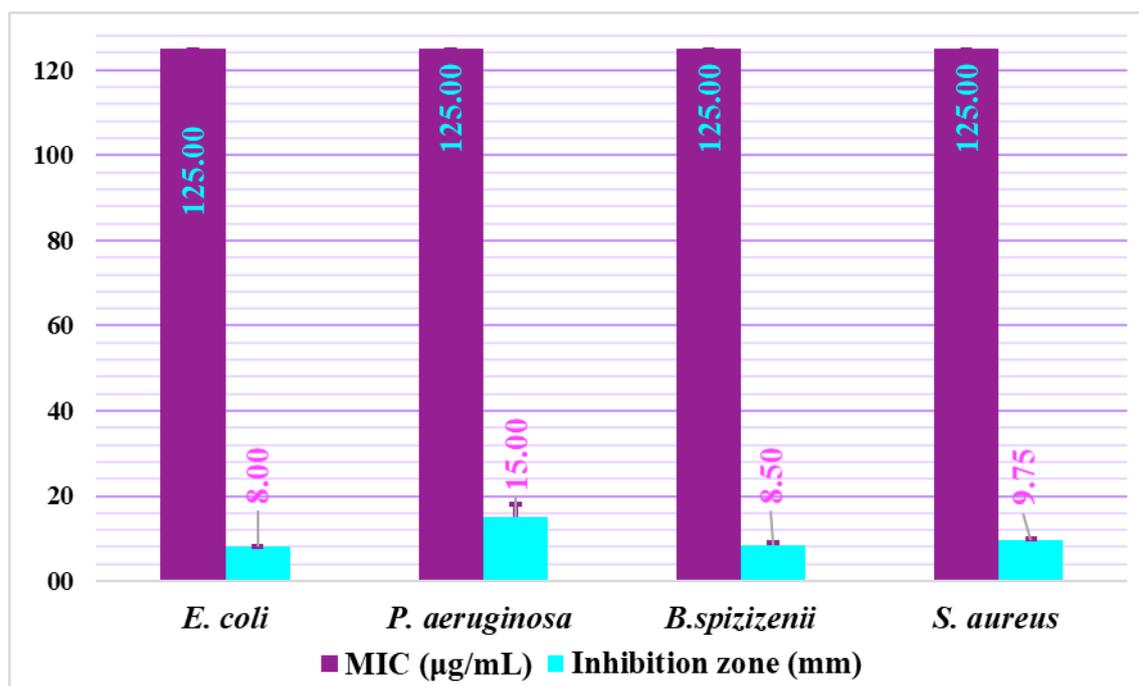
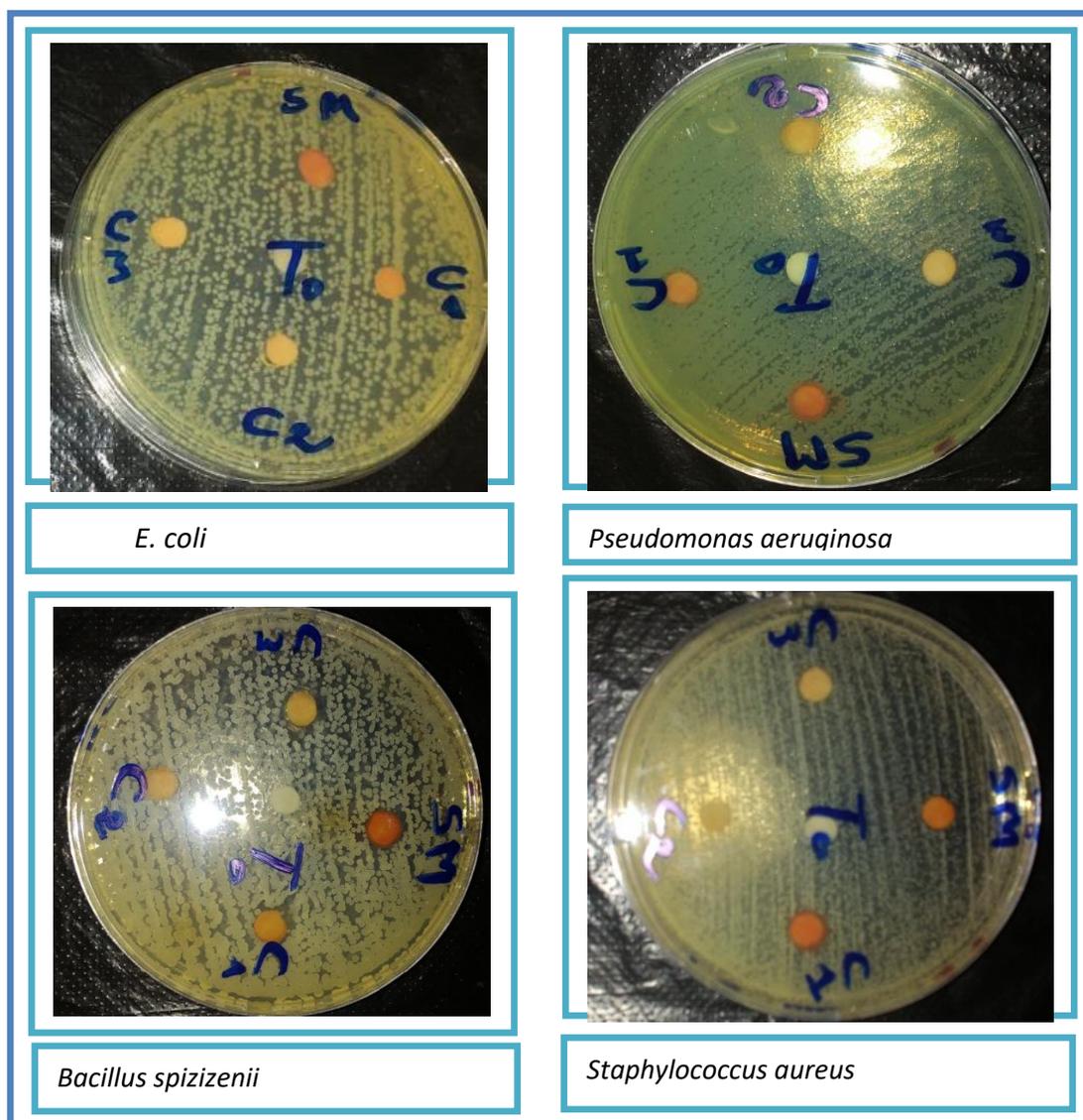


Figure 44 : Effet de l'extrait méthanolique de *Carthamus tinctorius* L. sur les bactéries étudiées.



**Figure 45 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) de *CarthamustinctoriusL.* sur les différentes souches dans différentes concentrations.

## 4.2.2.2. Colorantsynthétique (1-(3,4-chlorophenylazo)-2- naphthol) :



**Figure 46 :** Effet de colorant synthétique sur les bactéries étudiées.

**4.2.3. Comparaison de l'effet antibactérien entre l'extrait des plantes utilisé comme colorants naturels et le colorant synthétique de même couleur :**

**a- Entre l'extrait éthanolique et des deux plantes et le colorant synthétique :**

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des deux plantes et du colorant n'a montré aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches bactériennes testées.

**b- Entre l'extrait méthanolique des deux plantes :**

Si nous comparons les diamètres d'inhibition du l'extrait méthanolique de *Carthamus tinctorius* L. Par rapport au l'extrait méthanolique de *Punica granatum* L, nous constatons que l'effet inhibiteur du *Carthamus tinctorius* L. est mieux que celui du *Punica granatum* L. pour les

4 souche bactériennes, avec des grands zones d'inhibition remarquable dans le SM et C1, qui correspondent respectivement à des concentrations de 100 mg/ml ; 50mg/ml.

#### ✓ Discussion générale

Les résultats obtenus à partir de notre étude sur le *Punica granatum* L. sont cohérents avec ceux rapportés par plusieurs auteurs qui ont rapporté que les extraits alcooliques des fruits (écorces) de grenade ont montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* mais aucune activité contre *E.coli* (Ahmad et Beg,2001 ; Mathabe et al., 2006 ; Panichayupakaranant et al.,2010).De façon générale, nos résultats confirment les rapports de Nerg et Jayaprakasha (2003) et Opara et al. (2009) sur les activités antibactériennes d'écorce grenade. Leurs résultats ont montré un effet d'inhibitrice sur diverses bactéries Gram positif et Gram négatif.

Pour le colorant synthétique et l'extrait des fleurs du *Carthamus tinctorius* L. étudié dans ce travail nos résultats sont considérés comme premières de ce genre, parce que l'étude de l'activité antibactérienne de ce colorant n'a jamais fait l'objet d'une publication.

Cette différence de résultats peuvent être expliqués par l'absence ou la présence des principes actifs doués d'une activité antibactérienne, La membrane externe de l'enveloppe cellulaire des bactéries à gram négatif constituer une barrière efficace à haut niveau de résistance (Kebili, 2016), l'utilisation des souches cliniques (résistantes) ou encore les conditions de travail.

# *Conclusion et perspectives*



### Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale ; une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs qualifiés de métabolites secondaires.

Le présent travail avait pour objectif d'étudier l'évaluation d'une part la composition chimique globale et d'autre part la teneur en composés phénoliques, ainsi qu'une mise en évidence une évaluation biologique de deux plantes médicinales (*Punica granatum* L. et *Crathamus tinctorius* L.) et un colorant synthétique (1-(3,4 chlorophenylazo)-2- naphthol).

Les rendements des deux plantes après extraction méthanolique, éthanolique, et aqueux sont variables, cependant le rendement le plus important est signalé dans l'extrait éthanolique de *Crathamus tinctorius* L. (**86%**) et dans l'extrait méthanolique de *Punica granatum* L. (**49%**).

Le screening phytochimique démontre la richesse de *Punica granatum* L. et *Crathamus tinctorius* L. en métabolites secondaires « flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, et glycosides », et en substances naturelles potentiellement intéressantes pour leurs propriétés antioxydantes.

Les résultats du dosage quantitatif des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que l'extrait méthanolique de *Crathamus tinctorius* L. est l'extrait le plus riche en polyphénols, suivi par l'extrait de *Punica granatum* L, avec les valeurs respectives suivantes : (**1,906±18,85 mg EAG/g**) et (**1,178±3,77 mg EAG/g**). Par contre à l'extrait éthanolique le *Punica granatum* L. est l'extrait le plus riche en polyphénols, suivi par l'extrait de *Crathamus tinctorius* L, avec les valeurs respectives suivantes: (**0,432±0,23 mg EAG/g**), et (**0,082±0,40 mg EAG/g**).

Les résultats obtenus pour la mesure de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion du disque en milieu gélosé indiquent que l'extrait méthanolique du *Punica granatum*

L. a une action inhibitrice faible par rapport aux l'extrait méthanolique de *Crathamus tinctorius* L. mais en contrepartie le colorants synthétique et l'extrait éthanolique des deux plants ne possèdent aucune activité antibactérienne.

L'activité antioxydante moyenne de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* L, *Crathamus tinctorius* L, et le colorant 1-(3,4 chlorophenylazo)-2- naphthol a été évaluée par le spectrophotomètre en suivant la réduction du radical DPPH possèdent un effet scavenger sur le radical DPPH élevé avec un IC50 de **0,42±0.04mg /ml**, **0.16±0.08 mg/ml**, et **0,39±0,26 mg/ml** respectivement. Par conséquent, ces extraits pourraient donc constituer une alternative à certains additifs synthétiques. Cependant, cette activité reste néanmoins nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique, mais il s'agit d'extraits bruts qui contiennent un grand nombre de composés qui, une fois purifiés, peuvent présenter une activité similaire à celle de l'acide ascorbique. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier ces constituants.

Enfin on pourrait conclure que ces plantes contient une quantité notable de polyphénols peut jouer un rôle majeur dans la différente activité, et peuvent être des sources naturelles de composés antioxydants et antimicrobien.

# *Références bibliographiques*



**Références bibliographiques :**

**A**

- **Achat, S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : Extraction : pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques. Thèse de doctorat de l'université A. Mira Bejaia, 1-11,261.
- **Afaq, F. et Malik, A. (2005).** Pomegranate Fruit Extract Modulates UV-B-mediated Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinases and Activation of Nuclear Factor Kappa B in Normal Human Epidermal keratinocytes. *Photochemistry and photobiology*, 81(1): 38-45.
- **Ahmad I, and Beg A.Z. (2001).** Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens.J. *Ethnopharmacol.*
- **Ali-Shtayeh, MS., Yaghmour, RM-R., Faidi, YR., Salem, K., Al-Nuri, MA. (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of ethnopharmacology*, 60,265-271.
- **Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., et Di Ilio, C. (2013).** Escherichia coli in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- **Alam, R.; Kim, S.M.; Lee, J.I.; Chon, S.K.; Choi, S.J.; Choi, I.H. and Kim, N.S. (2006).** Effects of safflower seed oil in osteoporosis induced -Ovariectomized Rats. *Am. J. Chin. Med.*, 34:601-612.
- **Anonymous (2020a).** <https://www.helgilibrary.com/charts/which-country-produces-the-most-safflower-seeds>
- **Angelos, M.G., Kutala, V.K., Torres, C.A., Hegstoner, J.D., Mohammed, M., Oerannan, K. (2005).** Hypoxic reperfusion of the is chemic heartlands oxygen radical generation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiolog.*, 290: 341- 347.
- **Aoul, T.K. (1989).** Cours de biochimie, étude des lipides et des lipoprotéines. Office des publications universitaires. P: 5-6, 55-56, 64, 77.

- **Arung, E.T.; Wicaksono, B.D.; Handoko, Y.A.; Kusuma, I.W.; Shizu, K.; Yulia, D.; Sandra, F. (2017).** Cytotoxic effect of artocarpin on T47D cells. *J. Nat. Med.* 2010, 64, 423–429.
- **Ayaweera, D.M.A. (1980).** Medicinal Plants (Indigenous and Exotic) Used in Ceylon Part 2; National Science Council of Sri Lanka: Colombo, Sri Lanka pp. 162–163.

## ***B***

- **Barteková, M., Adameová, A., Görbe, A., Ferenczyová, K., Pecháňová, O., Lazou, A., Dhalla, N.S., Ferdinandy, P., Giricz, Z. (2021).** Natural and synthetic antioxidants targeting cardiac oxidative stress and redox signaling in cardiometabolic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 169, 446-477.
- **Belaid .D.J., (2017).** Collection Brochures Agronomiques Algérie : la culture du carthame. Une culture pour produire de l'huile en zone sèche. P.21.
- **Benali, K. et Guenfoud, N. (2016).** Flavonoïdes et activité anticancer et antibactérienne d'une espèce de la famille des Asteraceae.p45
- **Bendjabeur S., 2012.** Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade *Punica granatum L.*) en vue de leur utilisation alimentaire. P72
- **BenYahkem M.L, Hadjadj S, Others., 2018:** Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des trois espèces: *Punicagranatum L.* (Grenadier); *Zeamays L.*(Maïs) et *Lawsoniainermis L.*(Henné)., Thèse de doctorat.
- **Ben Nasr C., Ayed N. et Metche M. (1996).** Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Z Lebensm Unters Forsch*, 203:374-378.
- **Bezenger L. et Pinkas M. et Francis T, 1990** « Plantes médicinales des régions tempérées », Maloin, Paris, P344.
- **Boizot, N. et Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, INRA.p 79-82.
- **Bouras. F., Houchi.A.(2013).** Etude de l'activité Antioxydante de La Plante *Rumex Vesicarius L.* Mémoire Master Académique, P28.

- **Bolou, G. E. K., Bagré, I., Ouattara, K., et Djaman, A. J.** (2011). Evaluation of the antibacterial activity of 14 medicinal plants in côte d'ivoire. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 335–340. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.3>
- **Bougueria H, Benosmane a, Benaouida M a, Bouchoul and S Bouaoud., (2013).**Organic compounds. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports* ISSN 1600-5368.p1
- **Bozin ,B., Mimica-Dukic ,N., Samojlik, I., Goran, A., Igetic ,R. (2008).** Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*.111(4) : Pp925929
- **Boyd, B., Ford, C., Koeple Michael, C., Gary, K., Horn, E., McAnalley, S., McAnalley, B. (2003).**Étude pilote de l'effet antioxydant d'ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience et Nutrition*, 4(6) : 7
- **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2ème Ed. Tec. et Doc Lavoisier, Paris. France.915 p

## C

- **Chang J.S, Lin C.Y(2001),** Decolorization kinetics of recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo dye decolorization determinants for *Rhodococcus* sp, *Biotechnology Letters*, pp 631-636.
- **Cho, S.H.; Jang, J.H.; Yoon, J.Y.; Han, C.D.; Choi, Y. and Choi, S.W.** (2011). Effects of a safflower tea supplement on antioxidative status and bone markers in postmenopausal women. *Nutr. Res. Pr.*, 5:20-27
- **Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M. et Kim J.M.** (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT- Food Science and Technology*. 39: 756-761

## D

- **Dallas, S. L L.F., 2010:** Bonewald, Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1192,437.
- **Dajue L, Mündel HH,(1996)** Safflower *Carthamus, Tinctorius* L. Italy: International Plant Genetic Resources Institute

- **David, J.C. (1996).** Biochimie métabolique. Technique et Documentation. Canada. P: 225.
- **Debuigne ; François.C. , 2009** « petit Larousse des plantes médicinales», Larousse, p 89.
- **Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousse lot, D. (2005).** Antioxydants et nutrition. In : Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques. Edt Tec Doc. Paris : Lavoisier, p 45-60, 261-276.
- **Deore Leena P, Bachhav Devidas G, Nikam Vikas K, Heda Amol J., (2016).** Study of anthelmintic and antimicrobial activity of peel extract of Punic granatum Linn. European Journal of Pharmaceutical and medical research, vol 3, no 4, p. 242-297.
- **Diallo D., (2000).**Ethno pharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: Glinus oppositifolius (Azoceae), Diospyros abyssinica (Ebenaceae), Entada africana (Minosaceae), Trichilia emetic (Meliaceae). Thèse de doctorat de recherche, Faculté des sciences de l'université de Lausanne Suisse
- **Diallo, A. (2005).** Étude de la phytochimie et des activités biologiques de Syzygium guineense willd. (Myrtaceae). Thèse de doctorat. Mali.
- **Doha, A.M.; Fouda, K.A. and Rasha, S.M. (2019).** In vitro anticancer activity of quinoa and safflower seeds and their preventive effects on non-alcoholic fatty liver. Pakistan J. Biol. Sci., 22:383-392.
- **Douhou N., Yani K., Thahrouch S., Idrissi Hassani L. M., Badoc A., et Gmira N. (2003).** Screeming phytochimique d'une endémique ibéro- Marocaine, Thynelaea lythroides. Bull.Soc. Pharm.Bordeaux, 142 : 61-78.
- **Du, S.; Deng, Y.; Yuan, H. and Sun, Y. (2019).** Safflower yellow B protects brain against Cerebral Ischemia reperfusion injury through AMPK/ NF-kB Pa thway. Evid. Ba sed Complement. Altern. Med., 19:7219740.
- **Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M. (2008).** Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdjakova A (ed) pp 19-43.
- **Durackova, Z., Djrolo, F., Hougbe, H., Avode, G., Attoulou, V., Addra, B., Eiserich, J.P., Patel, R.P., O'Donnell, V.B. (2008).** Pathophysiology of nitric oxide and related species free radical reactions and modification of biomolecules. Molecular Aspects of Medicine, 19: 221-357.

## *E*

- **Elmeskini, M. Kamal. (2011).** Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat Université Mohammed V – Rabat, P : 4.
- **Emongor V. Safflower (2010)** (*Carthamus tinctorius* L.) the underutilized and neglected crop: A review. *Asian J Plant Sci.* 2010; 9 (6):299–306. doi: 10.3923/ajps.2010.299.306.

## *F*

- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* : 108-117.
- **Fiorucci S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat, Nice. p211.
- **Flora von Deutschland, O.W.T., Schweiz, O.U.D., (1885).** Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera. Germany.
- **Fournier.P,( 1947).** «dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France », omnibus, p221-222.

## *J*

- **Jadot, G. (1994).** Antioxydants et vieillissement. John Libbey Eurotext.
- **Jeong, J.B.; Gwang, P. and Hong, S. (2016).** Anticancer activity of the safflower seeds (*Carthamus tinctorius* L.) through inducing cyclin D1 proteasomal degradation in human colorectal cancer cells. *Korean J. Pl. Res.*, 29:10.7732/kjpr.2016.29.3.297.
- **Jureka J., 2008.** Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punicagranatum* L.); A Review. *Alternative Medicine Review* volume 13. Number 2, 128-144.

## *H*

- **Hans. Kothe, 2007.** « 1000 plantes aromatiques et médicinales », Toulouse, p79.
- **Halliwell, B. (2008)** Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies Archives of biochemistry and biophysics 2008, 476, 107-112, doi:10.1016/j.abb.2008.01.028?
- **Harborne .J.B,** (1998).Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214.
- **Haton, C. (2005).** Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, p43.
- **Heber D. (2006).** Preface. In: Pomegranates Ancient Roots to Modern. Medicine CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 263p, ISBN: 0-8493-9812-6.
- **Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem. 2002, 13, 572–584, doi: 10.1016/s0955-2863(02)00208-5.
- **Hmid I., 2013:** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*PunicaGranatumL.*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Alimentation et nutrition. Université d'Angers, français p27.
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, 2(1) : 3-6.
- **HOPKINS W.G., 2003.** Physiologie végétale .édition de boeck université-Bruxelles - p: 267-283.

## *I*

- **Iqbal Hussain., 2011.** Moneeb Ur Rehman Khattak; Raiz ullah ; Zia Muhammad; Naeem Khan ; Farha Ali Khan ; Zahoor Ullah and Sajjad Haider, ; Phytochemicals screening and antimicrobial activities of selected medicinal plants of Khyberpakhtunkhwa Pakistan African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol.5(6).

## G

- **Garnier G,Bezanger-Beauquesne L, Debranx G ., 1961:** Ressources médicinales de la flore française.
- **Garnier Delamare., (1992).** Dictionnaire des termes de médecine. Editions Maloine, Paris.
- **Gautam S, Bhagyawant SS, Srivastava N (2015).** Detailed Study On Therapeutic Properties, Uses And Pharmacological Applications Of Safflower (Carthamus Tinctorius L.) Int J Ayurveda Pharm Res. 2015;2(3):5–16.
- **Ghazi F., et Sahraoui S., (2005).**Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia.Mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach.
- **Courchet L., 1897:** Traité de botanique comprenant l'anatomie et la physiologie végétales et les familles naturelles a l'usage des candidats au certificat d'études physiques, chimiques et naturelles des étudiants en médecine et en pharmacie, Baillière.
- **Guarrera PM (2006).** Household dyeing plants and traditional uses in some areas of Italy. J Ethnobiol Ethnomed. 2006; 2(1):9. doi: 10.1186/1746-4269-2-9.
- **GUILLARD, C; LACHHEB, H; HOUAS, A; KSIBI, M; ELALOUI, E; HERRMANN.** (2003). Influence of chemical structure of dyes, of pH and of inorganic salts on their photocatalytic degradation by TiO<sub>2</sub> comparison of the efficiency of powder and supported TiO<sub>2</sub>. J. Photochem. Photobiol. A- Chem. 158, 2003, p. 27-36.
- **Guo, X.; Zheng, M.; Pan, R.; Zang, B.; Gao, J.; Ma, H. and Jin, M. (2019).** Hydroxysafflor yellow A (HSYA) targets the platelet-activating factor (PAF) receptor and inhibits human bronchial smooth muscle activation induced by PAF. Food Funct., 10:4661-4673.

## K

- **KACI-MEZIANE Zoubida, BOUTEKRABT Linda, LAIDOUDI Djamila, MOUSSAOUI Tarek,MELAHI Nawel, AIT OUARAB Dahbia, DJEGHBOUB Meryam, MEGUETAOUI Asma. 2017.** ÉVALUATION PHYTOCHIMIQUE, ET

POTENTIEL ANTIOXYDANT, ANTIBACTÉRIEN DE TROIS CULTIVARS DE FRUIT DE GRENADIER "PUNICA GRANATUM L" DU NORD EST D'ALGÉRIE.

- **KADIRVELY K. ; KAVIPRIYA M. ; KARTHIKA C. ; RADHIKA M. ; VENNI N. ; PATTABHI S.** (2003) *Bioresource Technol*; 87;1 ; 129;
- **Kamel Zemour, Amina Labdelli , Ahmed Adda, Abdelkader Dellal, Thierry Talou, and Othmane Merah., (2019).** Content and Antioxidant and Antiaging Activity of Safflower Seed Oil (*Carthamus Tinctorius L.*)
- **Kanoun K, Abbouni B, Benine M.L, Benmahdi F.Z,Marouf B, (2014).** Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorces de *Punica granatum linn* sur deux souches phytopathogènes: *Ascochyta rabiei* (pass.) labr. Et *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersic*, *European scientific journal*, 10(12).
- **Kim SK, Cha JY, Jeong SJ, Chung CH, Choi YR, Cho YS.(2000)** Properties of the chemical composition of safflower (*Carthamus tinctorius L.*) sprout. *Korean J Life Sci* 2000; 10:68-73.
- **Khalid, N.; Khan, R. S.; Hussain, M. I.; Farooq, M.; Ahmad, A. and Ahmed, I. (2017).** A comprehensive characterisation of safflower oil for its potential applications as a bioactive food ingredient: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 66:176-186.
- **Khiati, M. (1998).** Guide des maladies infectieuses et parasitaires. OPU, Alger.
- **Kulkarni A. P, Aradhya S. M, et Divakar S., (2004).** Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant: *Punica lagin* from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry*, 87; 551-557.
- **Kumar, K.A., Renuka, N., Pavithra, G., Kumar, G.V. (2015).** Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(9): 67-81.

## *L*

- **Lansky, E.P., Newman, R. A., 2007.** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. ethnopharm.* N°109. Pages 177-206

- **Lee, J.Y., E.J. Chang, H.J. Kim, J.H. Park and S.W. Choi.**(2002) Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Arch. Pharm. Res.* 25: 313–319.
- **Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M. (1995).** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.
- **Lewis, K.; Ausubel, F.M. (2006).** Prospects for plant-derived anti-bacterial. *Nat. Biotechnol.* 24, 1504–1507.
- **Li, C.C., C.Z. Yang, X.M. Li, X.M. Zhao, Y. Zou, L. Fan, L. Zhou, J.C. Liu and Y.C. Niu. (2012)** Hydroxysafflor yellow A induces apoptosis in activated hepatic stellate cells through ERK1/2 pathway in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46: 397–404, 2012.
- **Lohan, S. B., Ivanov, D., Schuler, N., Berger, B., Zastrow, L., Lademann, J., Meinke, M. C. (2021).** Switching from healthy to unhealthy oxidative stress—does the radical type can be used as an indicator? *Free Radical Biology and Medicine*, 162, 401-411.
- **Lu, Q.Y.; Ma, J.Q.; Duan, Y.Y.; Sun, Y.; Yu, S.; Li, B. and Zhang, G.M. (2019).** Carthamin yellow protects the heart against ischemia/reperfusion injury with reduced reactive oxygen species release and inflammatory response. *J. Cardiovasc. Pharm.*, 74:228-234
- **Lumbu S; Kahumba B; Kahambwe T; Mbayo T; Kalonda M; Mwamba M; Penge O (2005).**Contribution à l'étude de quelques plantes médicinales anti diarrhéiques en usage dans la ville de Lubumbashi et ses environs, *Annales de Pharmacie*, 3 (1) : 75 86.
- **Luo, Z.; Zeng, H.; Ye, Y.; Liu, L.; Li, S.; Zhang, J. and Luo, R. (2015).** Safflower polysaccharide inhibits the proliferation and metastasis of MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.*, 11:4611-4616.

## ***M***

- **Maclaren K(1985), « The Colour Science of Dyes and Pigments », Adam Hilger Ltd., Boston.**
- **Madigan MT, Martinko JM, Parker J. (1997).** Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall International Editions.

- **Malviya S, Alok Jha A, et Hettiarachchy N., (2014).** Antioxydant and Antibacterial Potential of Pomegranate Peel Extracts. *Journal Food Science Technology*, 51(12), 4132-4137.
- **Mani, V; Lee, S.K.; Yeo, Y. and Hahn, B.S. (2020).** A metabolic perspective and opportunities in pharmacologically important safflower. *Metabolites*, 10(253):1-18.
- **MANSOUR A., 2009-** Investigation photochimique de l'extrait n-butanol de l'espèce *Centauria Africana*.
- **Marc T.; Gerard W.; Denis L (2001).** Classification des anti-inflammatoires in *Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4ème Edition. P 426.*
- **Marouf, A., Reynaud, J. (2007).** *La Botanique d'A à Z, 1662 définitions, Dunod, Paris, p69.*
- **Masson, O. (2007).** *Biochimie, base biochimique de la diététique. Lavoisier. P: 83-86, 91.*
- **Mathabe M. C., Nikolova R. V., Lall N., & Nyazema N. Z., 2006.** Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhea in Limpopo Province. *South African Journal of Ethnopharmacology*, Vol, 31, p.p. 68-70.
- **Migdal, C., Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine sciences*, 27(4) : 405-412.
- **Mioulane, P. (2008).** « le grand Larousse des 15000 plantes et fleurs de jardin », Protea, P83
- **Mohamed Amine Ben Abdennebi, 2012.** Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK. *Mémoire., Fac. Med. Tunis, 82p.*
- **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211.
- **Monsieur B., (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutiosum* Perr. Ex : (Combretaceae). *Mémoire Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat). Université de Bamako. Mali. P: 141.*
- **Moualkia H et Gourmati M., (2015).** Détermination de substances naturelles à potentialités antioxydante et anti-inflammatoire de plantes *Punica granatum L* et *Lawsonia inermis*. P112

- **Naczk, M., et Shahidi, F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.
- **Najjaa H., Neffati M., Zouari, S. et Ammar, E. (2007).**Essential oil composition and Antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum*L. A North African endemic species. *C. R. Chimie*, 10: 820-826
- **Negi P.S., Jayaprakasha G.K. et Jena B.S. (2003).** Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80: 393–397.
- **Nicklin, J., Graeme-cook, K., Paget, T., Killington, R. (2000).** L'essentiel en Microbiologie, Paris, Berti édition.
- **Nicola M., et Daniel C. (1998).** Activité technologiques en microbiologie-Téchniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'aquitaine - Bordeaux, 152p

## *O*

- **Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S. et Chowwanapoonpohn S. (2007).** Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103: 839–846.
- **Opara L. U., Al-Ani M. R. & Al-Shuaibi Y. S., 2009.**Physico-chemical Properties, Vitamin C Content, and Antimicrobial Properties of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L.). *Food Bioprocess Technol* (2009) 2:315-321.
- **Ozcal, N. and S. Dinc., (1993).** Evaluation of the pomegranate (*Punic granatum* L) peels from the standpoint of pharmacy. *Ecsailik Fakultes Dergisi* 22:21-29.

## *P*

- **Panichayupakaranant P., Tewtrakul S.& Yuenyongesawad S., 2010.** Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardized pomegranate rind extract. *Food Chemistry* 123, 400-403.
- **Percival SL, (2004).** *Microbiology of waterborne diseases*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, p. 480.

- **Peronny, S. (2005).** La perception gustative et la consommation des daniens chez le Maki (Lémur catta). Thèse de doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Ecoéthologie, p151.

## *Q*

- **Qu, C.; Zhu,W.; Dong, K.; Pan, Z.; Chen, Y.; Chen, X.; Liu, X.; Xu,W.; Lin, H. and Zheng, Q. (2019).** Inhibitory effect of hydroxysafflor yellow B on the proliferation of human breast cancer MCF-7 Cells. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, 14:187-197.

## *R*

- **Rabie Kachkoul ,Tarik Squalli Houssaini, Mohamed Mohim , Radouane El Habbani, and Anissa Lahrichi., (2020).**Chemical Compounds Identification and Antioxidant and Calcium Oxalate Anticrystallization Activities of Punica granatum L.
- **Ribéreau-Garyon.P. 1968 :** Les composés phénoliques des végétaux.Edition Dunod Paris, p 254
- **ROBERT, D; PARRA, S; PULGARIN, C; KRZTON, A; J.V. Weber. (2000)** Chemisorption of phenols and acids on TiO<sub>2</sub> surface. *Appl. Surf. Sci.* 167, 2000, p. 51-58.
- **Robak, J. and R.J. Gryglewski (1988)** Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37: 837–841, 1988.

## *S*

- **Salem,N., Msaada, K.,Hamdaoui,G., Limam,F., Marzouk, B.,(2011):**Variation in Phenolic Composition and Antioxidant Activity during Flower Development of Safflower *Carthamus tinctorius L.**Journal of Agricultural and Food Chemistry.*59,4455–4463.
- **Sandhya, S.; Vinod, K.; Chandra, S.; Aradhana, R.; Vamshi, S. (2010).** An Updated Review on *Trichosanthes cucumerina, L.* *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 1, 56–58.

- **Shah, S.L.; Mali, V.R.; Zambare, G.N.; Bodhankar, S.L. (2012).**Cardioprotective activity of methanol extract of fruit of *Trichosanthes cucumerina* on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Wistar rats. *Toxicol.Int.* 19, 167–172.
- **Sajjad W, Sohail M, Ali B, Haq A, Din G, Hayat M, Khan I, Ahmad M, Khan S., (2015).** Antibacterial activity of *Punica granatum* Peels extract. *Mycopath*, vol 13, p 105-111
- **Singh V, Nimbkar N (2006).** Safflower (*Carthamus tinctorius* L) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Boca Raton: CRC press.
- **Sitzia G., 2009:** La Grenade, une bombe de jeunesse.
- **Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., and Knez, Ž (2005).** "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities." *Food Chemistry*, 89(2), 191-198.
- **Story T., 2007.** La grenade. Le fruit médicament. *NEXUS* n 51.pp.46-54.
- **Stover E. et Mercure E. W. (2007).** The Pomegranate: A New Look at the Fruit of Paradise *HortScience*, 42(5): 1088-1092.
- **Spichiger, R., Calenge, C., Bise, B. (2004):** Geographical zonation in the Neotropics of tree species characteristic of the Paraguay-Paraná Basin. *Journal of Biogeography*. 31, 1489–1501.
- **Sultana B., Anwar F., Rafique Asi M. and Ali Shahid Chatha S., 2008.** Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas y aceites*. 59 (3).

## ***T***

- **Talbi.H., Boumaza. A., El-mostafa.K., Talbi. J. et Hilali. A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Journal of Materials and Environmental Science*, 6 (4) : 1111-1117.
- **Tiziana Bacchetti, Camilla Morresi, Luisa Bellachioma, and Gianna Ferretti. (2020).**Antioxidant and Pro-Oxidant Properties of *Carthamus Tinctorius*, Hydroxy Sa\_or Yellow A, and Sa\_or Yellow A.

- **Trease E. et Evans W.C.**, (1987). *Pharmacognosie*, Billiaire Tindall. London 13th ed.
- **TOUITOU PR.Y.**, 2005. *Biochimie: structure des glucides et lipides* PCEM 12005-2006. université paris -VI faculté de médecine Pierre et Marie Curieu.
- **Tzeng, C.W.; Tzeng, W.S.; Lin, L.T.; Lee, C.W.; Yen, F.L.; Lin, C.C.** (2015). *Artocarpus communis* induces Autophagic Instead of Apoptotic Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Phytomedicine* 23, 528–540

## V

- **Velazquez, E., Tournier, H.A., Mordujovichole, B.P., Saavedra, G., Scinella, G.R.** (2003). Antioxydant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74: 91-97.
- **Viji, G. S., Vasanthe, B., et Suresh, K.** (2013). Screening and antibacterial activity analysis of some important medicinal plants.
- **Villano D , Fernandez-Pachon M.L, Troncoso A.M, et Garcia-Parrilla M.C.**, (2007). Radical scavenging ability of polyphénolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71:230-235.

## W

- **Wald E.** (2009). *Le grenadier (Punica granatum L) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes*. Thèse de doctorat (Faculté de Pharmacie). Université Henri Poincaré - Nancy 1. 158p.
- **Weiss, E.A.** (1971). *Castor, Sesame and Safflower*. Barnes and Noble, Inc., New York, Leonard Hill Books, London, pp:529-744.
- **Wu, S.; Yue, Y.; Tian, H.; Li, Z.; Li, X.; He, W. and Ding, H.** (2013). *Carthamus tinctorius* L. exerts antioxidant and hepatoprotective effect against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats via the Nrf2 pathway. *J. Ethnopharmacol.*, 148:570-578.

## **Y**

- **Yuting, C., Z. Rongliang, J. Zhongjian and J. Yong.** Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 9: 19–21, 1990.

## **Z**

- **Zhou FR, Zhao MB, Tu PF. (2009).** Simultaneous determination of four nucleosides in *Carthamus tinctorius* L. and Safflower injection using high performance liquid chromatography. *J Chin Pharmaceut Sci (Chin)* ; 18:326-30.

**Zhou X, Tang L, Xu Y, Zhou G, Wang Z. (2014)** Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology.* 2014;151(1):27–43. doi: 10.1016/j.jep.2013.10.050.

# *Annexes*

Annexes

Annexe 01 : matériel de laboratoire

|   |  |   |
|---|--|---|
|    |    |    |
| <p>Bain marie</p>   | <p>Agitateur (vortex)</p>  | <p>Plaque chauffante</p>  |
|   |   |   |
| <p>Bec bunsen</p>   | <p>Pied à coulisse</p>   | <p>Spectrophotomètre</p>  |
|  |  |  |
| <p>Balance à précision</p>  | <p>Agitateur magnétique chauffant</p>  | <p>Etuve</p>  |

|  |   |   |
|--|---|---|
|   |   |  |
| <p>Autoclave</p>   | <p>Evaporateur rotatif</p>  | <p>Agitateur va et vient</p>  |
|  |  |   |
| <p>Ph mètre<br/>Spectrophotomètre</p>  | <p>Balance</p>  |   |

## 1. Local de travail



Laboratoire de centre universitaire de Mila

---

## 2. Les Verreries

---

|                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| <b>Flacons</b>            | <b>verres à montre</b>          |
| <b>Bécher</b>             | <b>micros pipettes</b>          |
| <b>Erlenmeyer</b>         | <b>boites de pétri en verre</b> |
| <b>Entonnoir</b>          | <b>tube à essai</b>             |
| <b>papier filtre</b>      | <b>tubes secs à bouchons</b>    |
| <b>barreau magnétique</b> | <b>pince</b>                    |
| <b>spatule</b>            | <b>boite de pétri.</b>          |
| <b>pipettes</b>           | <b>portoirs</b>                 |

---

## 3. Les produits chimique

---

|   |   |
|---|---|
| <b>Méthanol</b>                                       | <b>Chloroforme</b>  |
| <b>Ethanol</b>  | <b>Anhydride acétique</b>                                 |
| <b>Acide chlorhydrique (HCl)</b>                      | <b>Hydroxyde de potassium(KOH)</b>                        |
| <b>Copeaux de magnésium</b>                           | <b>Liqueur de Fehling</b>                                 |
| <b>Iodure de potassium</b>                            | <b>Ether de pétrole</b>                                   |
| <b>Eau distillé</b>                                   | <b>Carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</b> |
| <b>Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>)</b>           | <b>Acide ascorbique DPPH</b>                              |
| <b>Ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH)</b>                  | <b>L'eau physiologie</b>                                  |
| <b>Acide Sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b> | <b>DMSO</b>   |
| <b>Hydroxyde de sodium (NaOH)</b>                     | <b>Muller-Hinton.</b>                                     |

---

### Annexe 02 : Préparation des solutions pour l'analyse biochimique

➤ **Ethanol 70%**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Ethanol.....      | 70 ml |
| Eau distillé..... | 30ml  |

➤ **Méthanol 80%**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Méthanol .....    | 80 ml |
| Eau distillé..... | 20ml  |

➤ **Carbonate de sodium**

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| Carbonate de sodium ..... | 7,5g  |
| Eau distillé.....         | 100ml |

➤ **DPPH**

|               |         |
|---------------|---------|
| DPPH.....     | 0,004 g |
| Méthanol..... | 100 ml  |

➤ **Folin-Ciocalteu**

|                      |     |
|----------------------|-----|
| Folin-Ciocalteu..... | 1ml |
| Eau distillé.....    | 9ml |

**Annexe 03: Réactifs utilisés pour le screening phytochimique**➤ **Réactif de Wagner**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Iodure de potassium..... | 2 g     |
| Iode.....                | 1 ,27 g |
| Eau distillée.....       | 100ml   |

➤ **HCL (10%)**

|           |   |                       |
|-----------|---|-----------------------|
| 10 ml HCl | → | 90ml d'eau distillé.  |
| 0,5ml HCl | → | 4,5ml d'eau distillé. |

➤ **HCl (1%)**

|            |   |                        |
|------------|---|------------------------|
| 1ml HCl    | → | 99ml d'eau distillé.   |
| 0,1 ml HCl | → | 99,9ml d'eau distillé. |

➤ **KOH (10%)**

|          |   |                       |
|----------|---|-----------------------|
| 10g KOH  | → | 100ml d'eau distillé. |
| 0,5g KOH | → | 5ml d'eau distillé    |

➤ **FeCl<sub>3</sub> (1%)**

|                         |   |                       |
|-------------------------|---|-----------------------|
| 1g FeCl <sub>3</sub>    | → | 100ml d'eau distillé. |
| 0,5 g FeCl <sub>3</sub> | → | 50ml d'eau distillé.  |

➤ **NaOH (1%)**

|           |   |                       |
|-----------|---|-----------------------|
| 1g NaOH   | → | 100ml d'eau distillé. |
| 0,5g NaOH | → | 50ml d'eau distillé.  |

➤ **NH<sub>4</sub>OH (10%)**10ml NH<sub>4</sub> OH → 90ml d'eau distillé.0,5ml NH<sub>4</sub> OH → 4,5ml d'eau distillé**Annexe 04 : Composition des principaux Milieux de culture utilisés**➤ **Milieux liquides****Eau physiologique stérile**

Chlorure de sodium (NaCl)..... 0,9g

Eau distillée..... 100ml

➤ **Milieux solides****Gélose Muller Hinton (MH)**

Gélose Mueller Hinton poudre..... 38g

Eau distillée..... 1L

**Annexe 05: Résultats du screening phytochimique****A- Pour la plante *Punica granatum* L:****Tableau 1:** Résultats d'analyse phytochimique des métabolites primaires et secondaires

| Test phytochimique           | Résultat | Description des résultats   | Photo   |
|------------------------------|----------|---|---|
| <b>métabolites primaires</b> |          |   |   |
| Test des protéines           | ±        | - L'apparition d'une coloration violette claire, indique la présence des protéines mais avec des faibles quantités. |  |

|                                |     |  |   |
|--------------------------------|-----|--|---|
| Test des lipides               | -   | - La coloration violette signifiée la présence des lipides dans le <i>Punica granatum</i> L.   |    |
| <b>métabolites secondaires</b> |     |  |   |
| Test des flavonoïdes           | +++ | - La coloration rouge obtenue, confirme l'existence des flavonoïdes dans <i>Punica granatum</i> L.   |    |
| Test des alcaloïdes            | ++  | - La présence des alcaloïdes est confirmée par la présence d'une précipitation brune au contact avec le réactif de Wagner.   |  |
| Test des stérols               | +   | - La présence d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides, et la présence de la coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence des stérols |  |

|                      |     |   |   |
|----------------------|-----|---|---|
| Test des coumarines  | +++ | - Les coumarines sont présentes dans l'extrait de <i>Punica granatum</i> L. ce test est témoigné par la présence d'une précipitation rouge brune.           |    |
| Test des glycosides  | ++  | - La Formation d'un précipité rouge brique, indique la présence des glycosides dans les extraits de <i>Punica granatum</i> L. avec une quantité importante. |    |
| Test des saponosides | -   | - l'absence d'une mousse confirme l'absence des saponines dans la <i>Punica granatum</i> L.   |  |
| Test des tanins      | +++ | - La coloration bleu noir obtenue, confirme l'existence des tanins dans <i>Punica granatum</i> L. (tanins galliques).                                       |  |

|                            |   |  |   |
|----------------------------|---|--|---|
| Test des stéroïdes         | ± | - L'apparition d'une coloration violette claire, vire au marron ; indique la présence des stéroïdes dans notre plante mais avec des faibles quantités.         |    |
| Test Anthraquinones libres | — | - Le résultat obtenu montre que le <i>Punica granatum</i> L. ne contient pas des anthraquinones libre, ce résultat est fondé par l'absence de coloration rouge |    |
| Test des quinones          | — | - La coloration jaune obtenue, confirme l'absence des quinones dans <i>Punica granatum</i> L. (l'absence Coloration rouge)                                     |  |

**B- Pour la plante *Carthamus tinctorius* L.**

**Tableau 02:** Résultats d'analyse phytochimique des métabolites primaires et secondaires

| Test phytochimique             | Résultat | Description des résultats  | Photo   |
|--------------------------------|----------|--|---|
| <b>métabolites primaires</b>   |          |  |   |
| Test des protéines             | -        | Le résultat obtenu montre que le <i>Carthamus tinctorius</i> L. ne contient pas des protéines, ce résultat est fondé par l'absence de la coloration violette . |    |
| Test des lipides               | -        | - l'absence de la coloration violette signifiée l'absence des lipides dans le <i>Carthamus tinctorius</i> L.   |   |
| <b>métabolites secondaires</b> |          |  |   |
| Test des flavonoïdes           | ++       | - La coloration jaune obtenue, confirme l'existence des flavonoïdes dans cette plante.   |  |
| Test des alcaloïdes            | ++       | - La présence des alcaloïdes est confirmée par la présence d'une précipitation brune au contact avec le réactif de Wagner.                                     |  |

|                      |    |   |   |
|----------------------|----|---|---|
| Test des stérols     | —  | <p>- Le résultat obtenu montre que le <i>Carthamus tinctorius</i> L. ne contient pas des stérols, ce résultat est fondé par l'absence de l'anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et l'absence de la coloration violette de la couche surnageant.</p> |    |
| Test des coumarines  | —  | <p>- Les coumarines sont absentes dans l'extrait de curcuma ; ce test est témoigné par l'absence d'une précipitation rouge brune.</p>   |   |
| Test des glycosides  | ++ | <p>- La Formation d'un précipité rouge brique, indique la présence des glycosides dans les extraits de <i>Carthamus tinctorius</i> L.</p>   |  |
| Test des saponosides | ±  | <p>- L'apparition d'une mousse persistante avec une hauteur de 0,4cm confirme la présence des saponines dans le <i>Carthamus tinctorius</i> L, mais avec une faible quantité.</p>   |  |

|                            |     |  |   |
|----------------------------|-----|--|---|
| Test des tanins            | +++ | - La coloration marron qui vire au vert obtenue, confirme l'existence des tanins dans <i>Carthamus tinctorius</i> L. (tanins catéchiqes).                            |    |
| Test des stéroïdes         | -   | - L'absence d'une coloration violette, indique que <i>Carthamus tinctorius</i> L. est pauvre en stéroïdes  |   |
| Test Anthraquinones libres | -   | -- Le résultat obtenu montre que le <i>Carthamus tinctorius</i> L. ne contient pas des anthraquinones libre, ce résultat est fondé par l'absence de coloration rouge |  |
| Test des quinones          | -   | -L'absence d'une coloration rouge, indique que <i>Carthamus tinctorius</i> L. est pauvre en quinone  |  |

## Annexe 06 : Dosage des polyphénols totaux

## 1- Extrait méthanolique

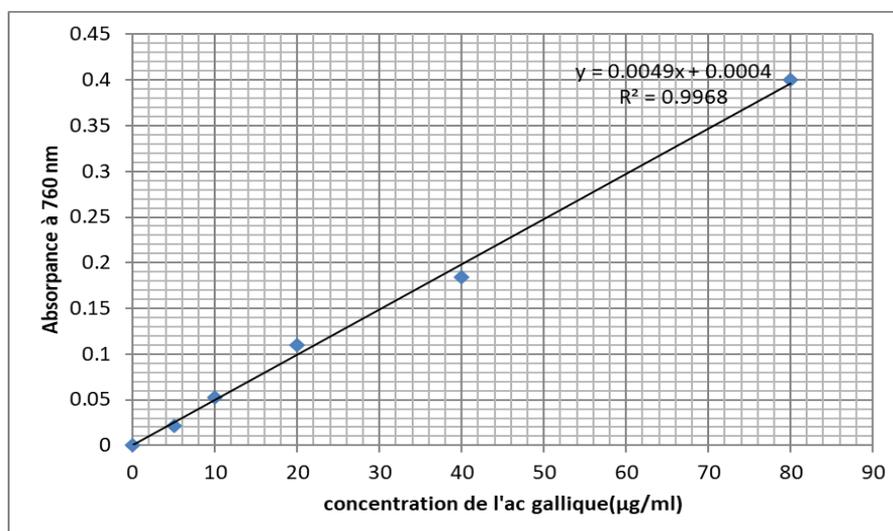


Figure : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableaux 03 : Teneur en polyphénols totaux de *Punica granatum* L. (extrait méthanolique)

| $X = (y/0.004) \times 32$ |                    |              |              |
|---------------------------|--------------------|--------------|--------------|
| <b>Y</b>                  | <b>0,147</b>       | <b>0,148</b> | <b>0,147</b> |
| <b>X</b>                  | <b>1176</b>        | <b>1184</b>  | <b>1176</b>  |
| <b>La moyenne</b>         | <b>1178.666667</b> |              |              |
| <b>ECARTYPE</b>           | <b>3,77123617</b>  |              |              |

Tableaux 04: Teneur en polyphénols totaux de *Crathamus tinctorius* L. (extrait méthanolique)

| $X = (y/0.004) \times 32$ |              |              |              |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Y</b>                  | <b>0,235</b> | <b>0,240</b> | <b>0,240</b> |
| <b>X</b>                  | <b>1880</b>  | <b>1920</b>  | <b>1920</b>  |

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| <b>La moyenne</b> | <b>1906,666667</b> |
| <b>ECARTYPE</b>   | <b>18,8561808</b>  |

## 2- Extrait éthanolique :

**Tableaux 05 :** Teneur en polyphénols totaux de *Punica granatum* L. (extrait éthanolique)

|                         |                    |              |              |
|-------------------------|--------------------|--------------|--------------|
| <b>X= (y/0.004) x 2</b> |                    |              |              |
| <b>Y</b>                | <b>0,864</b>       | <b>0,864</b> | <b>0,865</b> |
| <b>X</b>                | <b>432</b>         | <b>432</b>   | <b>432,5</b> |
| <b>La moyenne</b>       | <b>432,1666667</b> |              |              |
| <b>ECARTYPE</b>         | <b>0,23570226</b>  |              |              |

**Tableaux 06 :** Teneur en polyphénols totaux de *Crathamus tinctorius* L. (extrait éthanolique).

|                         |                   |              |              |
|-------------------------|-------------------|--------------|--------------|
| <b>X= (y/0.004) x 2</b> |                   |              |              |
| <b>Y</b>                | <b>0,163</b>      | <b>0,165</b> | <b>0,164</b> |
| <b>X</b>                | <b>81,5</b>       | <b>82,5</b>  | <b>82</b>    |
| <b>La moyenne</b>       | <b>82</b>         |              |              |
| <b>ECARTYPE</b>         | <b>0,40824829</b> |              |              |

## Annexe 07 : AAO

**Tableau 07 :** Absorbance des extraits de l'ASC

| <b>Acide ascorbique</b> |             |             |             |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Dilution</b>         | <b>1ère</b> | <b>2ème</b> | <b>3ème</b> |
| 3 ml                    | 0.182       | 0.183       | 0.183       |
| 2 ml                    | 0.282       | 0.283       | 0.283       |
| 1 ml                    | 0.388       | 0.391       | 0.391       |

**Tableau 08 :** Absorbance des extraits du colorant

| <b>1-(3,4-chlorophenylazo)-2- naphтол</b> |             |             |             |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Dilution                                  | <b>1ère</b> | <b>2ème</b> | <b>3ème</b> |
| <b>3 ml</b>                               | 0.195       | 0.189       | 0.190       |
| <b>2 ml</b>                               | 0.286       | 0.284       | 0.280       |
| <b>1 ml</b>                               | 0.402       | 0.410       | 0.409       |

**Tableau 09:** Absorbance des extraits du *Punica granatum* L.

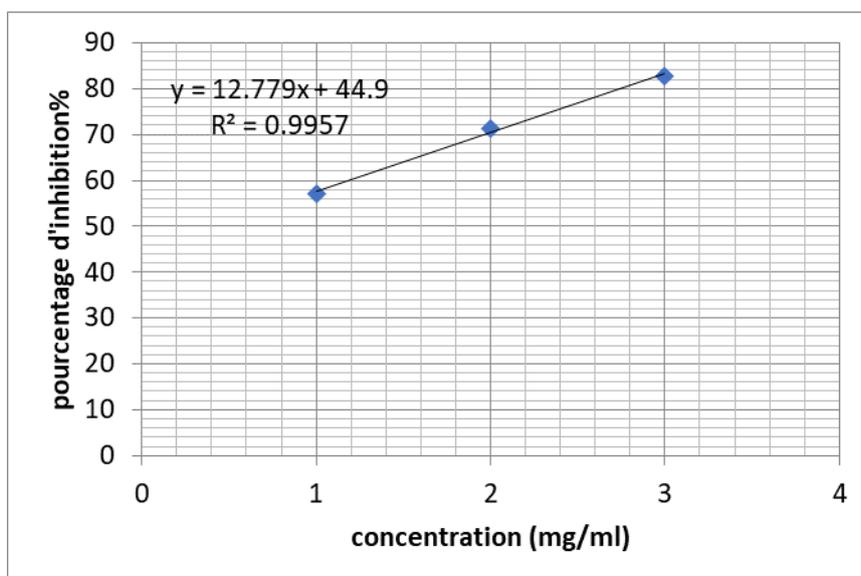
| <i>Punica granatum</i> L |             |             |             |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Dilution                 | <b>1ère</b> | <b>2ème</b> | <b>3ème</b> |
| <b>3 ml</b>              | 0.166       | 0.167       | 0.151       |
| <b>2 ml</b>              | 0.275       | 0.274       | 0,27        |
| <b>1 ml</b>              | 0,412       | 0,412       | 0.415       |

**Tableau 10:** Absorbance des extraits du *carthamus tinctorius* L.

| <i>carthamus tinctorius</i> L. |             |             |             |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Dilution                       | <b>1ère</b> | <b>2ème</b> | <b>3ème</b> |
| <b>3 ml</b>                    | 0.175       | 0.148       | 0.129       |
| <b>2 ml</b>                    | 0.282       | 0.260       | 0,262       |
| <b>1 ml</b>                    | 0.383       | 0.385       | 0.382       |

**Annexe 7 : Les pourcentages d'inhibitions :**

- **Extrait méthanolique du *Punica granatum* L**



**Figure :** Régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique de *Punica granatum L.* (de 1ère répétition).

| Dilution        | Inhibition % de 1ère répétition | Inhibition % de 2ème répétition | Inhibition % de 3ème répétition | MOYENN E   |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|
| 3 ml            | 82,7532                         | 82,6494                         | 84,3117                         | 83,24±0,93 |
| 2 ml            | 71,4286                         | 71,5325                         | 71,9481                         | 71,64±0,27 |
| 1 ml            | 57,1948                         | 57,1948                         | 56,8831                         | 57,09±0,18 |
| <b>Equation</b> | Y=12,77x + 44,9                 | Y=12,72 x + 45                  | Y=13,71 x + 43,66               |            |

➤ Extrait méthanolique du *carthamus tinctorius L.*

| Dilution        | Inhibition % de 1ère répétition | Inhibition % de 2ème répétition | Inhibition % de 3ème répétition | MOYENN E   |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|
| 3 ml            | 81,8182                         | 84,9234                         | 86,5974                         | 84,45±1,98 |
| 2 ml            | 70,7013                         | 72,9870                         | 72,7792                         | 72,16±1,03 |
| 1 ml            | 60,2078                         | 60,0000                         | 60,3117                         | 60,17±0,13 |
| <b>Equation</b> | Y=10,8x + 49,29                 | Y= 12,31x + 47,91               | Y= 13,14x + 46,94               |            |

➤ L'ASC

| Dilution        | Inhibition % de 1ère répétition | Inhibition % de 2ème répétition | Inhibition % de 3ème répétition | MOYENN E   |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|
| 3 ml            | 81,0909                         | 80,9870                         | 80,9870                         | 81,2±0,06  |
| 2 ml            | 70,7013                         | 70,5974                         | 70,5974                         | 70,63±0,06 |
| 1 ml            | 59,6883                         | 59,3766                         | 59,3766                         | 59,48±0,18 |
| <b>Equation</b> | Y=10,09x + 49,09                | Y= 10,8x + 48,71                | Y=10 ,80 x + 48,71              |            |

➤ Colorant (1-(3,4-chlorophenylazo)-2- naphthol)

---

| <b>Dilution</b> | <b>Inhibition % de 1ère répétition</b> | <b>Inhibition % de 2ème répétition</b> | <b>Inhibition % de 3ème répétition</b> | <b>MOYENN E</b> |
|-----------------|--|--|--|-----------------|
| 3 ml            | 79,7403                                | 80,3636                                | 80,2597                                | 80,12±0,33      |
| 2 ml            | 70,2857                                | 57,4026                                | 70,9091                                | 70,56±0,32      |
| 1 ml            | 58,2338                                | 57,4026                                | 57,5065                                | 57,71±0,45      |
| <b>Equation</b> | $Y=10,75x +47,91$                      | $Y= 11,48x + 42,09$                    | $Y=11,37 x + 46,80$                    |                 |