

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABDERAHMANE MIRA BEJAIA



Faculté de Technologie
Département de Génie des procédés



Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du Diplôme

Master

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

Présenté par :

KERBOUS Nacima

SEDDIK Cylia

Thème :

« Études des propriétés antioxydantes des extraits d'écorce de grenade (Punica Granatum L) : préparation d'une forme pharmaceutique par microencapsulation par double émulsion E/H/E »

Soutenance le : 03 juillet 2023

Devant le Jury composé de :

M^{me} BELHADJ Nadra, MCB, Présidente

M^{me} BOUARICHE Zakia, MAA, Examinatrice

M^{me} BELKACEMI Hayet, Professeur, Encadreur

Année Universitaire : 2022-2023

Remerciement

Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la Force et le courage d'accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier :

***M^{me} BELKACEMI.H** : Professeur à l'Université de Bejaïa, d'avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, sa patience, ses conseils précieux qu'elle nous a prodigué tout ou long de notre travail et pour le temps qu'elle nous a consacré.*

***M^{me} BELHADJ.N** : de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

***M^{me} BOUARICHE.Z** : d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **M^{me} AMRANI.Y**, Technicienne du laboratoire pharmaceutique de l'Université de Bejaïa, d'avoir consacré une partie de son temps pour nous, pour l'aide qu'elle nous a apporté et pour son encouragement à finir notre travail.*

*Nos remerciements sont aussi adressés à l'ensemble des techniciens de laboratoire de génie des procédés du bloc 11 plus précisément **M^{me} ADRAR.K**, ainsi que **M^{me} BARADAI** de nous avoir bien accueilli et de nous avoir compté parmi eux.*

Dédicaces

Du plus profond de mon cœur , je dédie ce travail à :

A la mémoire de ma Grand mère « Imma koko » tes souvenirs et ton visage restera gravé dans ma mémoire tu étais un témoignage de ma gratitude éternel envers toi. Repose en paix chère grand-mère et mon oncle maternelle « Vava lhocine » que dieu les accueille dans son vaste paradis.

A mon cher Grand père

« Vava rabia » qui me soutiennent et qui prient pour moi afin d'atteindre mes objectifs , que Dieu leur accorde une longue vie.

A ma très chère mère

Ma vie , ma force , ma fierté ,mon exemple de courage, celle qui a toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourage et a su nous combler de tendresse et d'affection , qu'elle trouve dans ce travail , l'expression d'éternelle reconnaissance et mon profond amour.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour , l'estime , le dévouement et le respect que j'ai pour toi. Tu es mon exemple , qu'il trouve ici, le fruit de ses sacrifices et le témoignage de mon grand amour et de ma gratitude la plus profonde.

Ceux qui m'ont tout donné leur amour, leur tendresse et leur soutien ainsi que pour tout ce qu'ils ont fait pour que je sois arrivée à ce stade. Dieu le tout puissant vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes oncles , mes tantes , mes cousin(e)s particulièrement « Kawther » et a toute ma famille « KERBOUS » et « TEKFA » qui ont toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager , que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A mes meilleures ami(e)s «Ouarda », «Sylia », « Zahir » et « cherif ».

A mon binôme « Cylia » qui connaît la valeur du travail d'équipe.

A tous mes ami(e)s qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite beaucoup de succès.

A tous la promotion 2023 du département « Génie des procédés » spécialité « Génie pharmaceutique » qui vont vraiment me manquer.

NACIMA

Dédicaces

Ce mémoire est bien plus qu'un simple document académique, il est le reflet de toutes les personnes exceptionnelles qui ont fait partie de ma vie et qui ont contribué à ma formation en tant qu'individu.

Ma chère mère, tu es ma source d'inspiration et ma plus grande admiratrice. Ton amour inconditionnel, ton soutien constant et tes précieux conseils m'ont donné la force et la détermination nécessaires pour poursuivre mes rêves. Je te dédie ce mémoire avec une profonde reconnaissance pour tout ce que tu as sacrifié pour moi.

Mon père bien-aimé, bien que tu nous aies quittés en 2009, ton héritage continue de briller dans ma vie. Tu étais un exemple de force, d'intégrité et de persévérance. Chaque mot que tu as prononcé et chaque acte que tu as posé continue de guider mes pas. Ce mémoire est dédié à ta mémoire, en souvenir des moments précieux que nous avons partagés.

Mon frère Smail, tu es un exemple de persévérance et de détermination. Ta volonté inébranlable de réussir m'a toujours inspiré. Tu as été mon guide et mon confident, et je suis fier de l'homme remarquable que tu es devenu. Ce mémoire est dédié à toi, en reconnaissance de tout ce que tu as fait pour moi.

Ma sœur Hayat, tu es ma complice et ma meilleure amie. Notre lien indéfectible est une bénédiction que je chéris chaque jour. Tu as toujours été là pour moi, prête à m'écouter, à me conseiller et à me soutenir. Je suis honoré de t'avoir comme sœur et je te dédie ce mémoire avec tout mon amour.

À mes grands-parents, à mes tentes paternelles à la famille Seddik et Malek,

À mes amies Karima, Lina, Nawal, Asma, Tina, Souad, Zahra, Lydia, Hanane, et à mon binôme « NACIMA » vous avez été mes piliers dans les moments de joie et de tristesse. Ce mémoire est dédié à vous tous, en reconnaissance de l'amitié sincère que nous partageons et à ce qui m'aime.

Cylia



Listes des abréviations

Abréviation	Mot complet
Abs	Absorbance
AE	Acide ellagique
AG	Acide gallique
Dex	Dextrine
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.
DCM	Dichlorométhane
E/H/E	Eau- huile-eau
EP	Ether de pétrole
EEP	Extrait éther de pétrole
EDCM	Extrait dichlorométhanique
EG	Écorce de grenade
HA	Hydroalcoolique
HE	Huile essentiels
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IRFT	Infrarouge à Transformation de Fourier
LDL	Lipoprotéines de faible densité
MeOH	Méthanol
mg Eq AG/ g Ex Sec	Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec
mg Eq Q / g Ex Sec	Milligramme quercétine par gramme d'extrait sec
Tr	Temps de rétention
PA	Principe actif
PEG	Le polyéthylène glycol
Qr	Quercétine
UV	Ultra-violet
µg Eq AG/mg	Microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait
µg Eq Q/mg d'extrait	Microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait



Listes des Figures

Chapitres I

Synthèses bibliographiques sur la plante *Punica granatum* L

Partie 1 : Généralité sur la plante *Punica granatum* L

Numéro	Titres de la figures	Page
Figure I.1.1	Fleur et fruit de grenade.	04
Figure I.1.2	« A » Le grenadier, « B » Les feuilles, « C » Les fleurs du grenadier.	06
Figure I.1.3	La grenade.	07
Figure I.1.4	Principales variétés de grenade dans le monde et en Algérie.	10
Figure I.1.5	Feuilles de <i>Punica granatum</i> .	11
Figure I.1.6	Fleurs de <i>Punica granatum</i> .	12
Figure I.1.7	Schéma global qui résume le métabolisme végétal.	15
Figure I.1.8	Motif flavan « a » et flavon « b » et numérotation systématique.	16
Figure I.1.9	Structure des acides benzoïques.	17
Figure I.1.10	Quelques exemples d'alcaloïdes.	18
Figure I.1.11	Quelques exemples de coumarines.	19
Figure I.1.12	Quelques structures des terpènes.	19
Figure I.1.13	Les d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes.	20

Partie 2 : Utilisations de *Punica granatum* L

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure I.2.1	Le grenadier en médecine traditionnelle.	22
Figure I.2.2	Maladies traitées par <i>Punica granatum</i> .	28
Figure I.2.3	Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.	29
Figure I.2.4	Origine et cibles des principaux dérivés réactifs de l'oxygène.	32



Chapitre II

Micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

Partie 1 : La Micro-encapsulation et la cinétique

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure II.1.1	Les formes galéniques.	41
Figure II.1.	Différent système de microparticules.	44
Figure II.1.3	Système de micro-encapsulation mécanique Nébulisation/séchage	45
Figure II.1.4	Différents états de la substance active à encapsuler en lit fluidisé	46
Figure II.1.5	Schéma du principe de la micro-encapsulation par polycondensation interfaciale.	46
Figure II.1.6	Réticulation interfaciale des microcapsules par coacervation complexe.	47
Figure II.1.7	Représentation de l'émulsion simple.	48
Figure II.1.8	Représentation de l'émulsion double.	49
Figure. II 1.9	Étapes de modélisation pharmacocinétique LADME.	52
Figure II.1.10	Représentation des profils de libération d'une substance active : immédiate, prolongée et contrôlée	53
Figure II.1.11	Profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules.	60
Figure II.12	PH et temps de séjour moyens dans les principales régions du tractus gastrointestinal.	61

Partie 2 : Méthodologie des plans d'expériences

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure II.2.1	Représentation du domaine expérimental pour un plan 2 ² .	65
Figure II.2.2	Plan composite pour deux facteurs.	68
Figure II.2.3	Plan de Box-Behnken à trois facteurs.	69



Chapitre III

Matériels et méthodes

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure III.1	Structure chimique de la punicaline.	71
Figure III.2	Broyage à l'aide d'un mortier en porcelaine.	72
Figure III.3	Broyage à l'aide d'un broyeur à couteaux.	72
Figure III.4	Tamis de 100 μm et balance analytique de précision.	73
Figure III.5	Procédés de macération.	74
Figure III.6	Filtration.	74
Figure III.7	Extraction par l'éther de pétrole.	76
Figure III.8	Extraction par le dichlorométhane.	77
Figure III.9	Résultat de l'extraction liquide-liquide.	77
Figure III.10	Principe de la réaction du réactif de Folin-Ciocalteu	78
Figure III.11	Schéma des étapes de la préparation d'échantillon de l'extrait du l'écorce de grenade.	79
Figure III.12	Formule chimique de la Quercétine.	79
Figure III.13	Schéma de réaction des flavonoïdes avec chlorure d'aluminium	80
Figure III.14	Schéma des étapes de préparation de l'échantillon.	81
Figure III.15	Représente la formule globale du DPPH.	81
Figure III.16	Schéma des étapes de dilutions de l'extrait HE et de mesure de l'activité Anti-oxydante par le DPPH.	82
Figure III.17	Représentation de la formule chimique du polyéthylène glycol.	84
Figure III.18	Représentation de la formule chimie de la dextrine	85
Figure III.19	Représentation de la formule chimique du glutaraldéhyde.	85
Figure III.20	Schéma de la réaction de dimérisation de l'acide gallique en acide ellagique.	86
Figure III.21	La phase dispersée.	89
Figure III.22	La phase continue.	89
Figure III.23	Filtration.	90



Figure III.24	Installation du dissolu test mise en œuvre pour l'étude de la cinétique de libération.	92
----------------------	--	-----------

Chapitre IV

Résultats et discussion

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure IV.1	Courbe de dosage des polyphénols totaux.	94
Figure IV.2	Histogramme de variation des teneurs en polyphénols totaux dans les extraits des écorces de grenade (<i>Punica Granatum</i>).	94
Figure IV.3	Courbe de dosage des flavonoïdes totaux.	95
Figure IV.4	Histogramme de variation des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits d'écorces de <i>Punica granatum</i> .	96
Figure IV.5	Histogramme de l'activité anti-oxydante et pouvoir d'inhibition des extraits d'écorce de grenade (<i>Punica Granatum</i>).	98
Figure IV.6	Chromatogrammes de HPLC des standards, acide gallique et quercétine.	101
Figure IV.7	Chromatogrammes de HPLC des différents extraits des écorces de <i>Punica Granatum</i> .	102
Figure IV.8	Diagramme de Pareto des effets des termes sur EEP%.	106
Figure IV.9	Diagramme d'optimisation de la réponse pour EEP %.	107
Figure IV.10	Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEP%.	108
Figure IV.11	Diagrammes Surfaces –Réponses ou contours pour EEP%.	109
Figure IV.12	Diagramme de Pareto des effets pour EEF %.	111
Figure IV.13	Diagramme d'optimisation de la réponse pour EEF %.	112
Figure IV.14	Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEF%.	113
Figure IV.15	Diagrammes Surfaces –Réponses ou contours pour EEF%.	114
Figure IV.16	Cinétique de la libération des polyphénols.	116
Figure IV.17	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH% en fonction du temps.	117
Figure IV.18	Spectre infrarouge IRFT de l'acide gallique dans le KBr.	118



Listes des Figures

Figure IV.19	Spectre infrarouge IRFT de l'acide ellagique dans le	118
Figure IV.20	Spectre infrarouge IRFT de la quercétine dans le KBr.	119
Figure IV.21	Spectre infrarouge IRFT du glutaraldéhyde dans le KBr	119
Figure IV.22	Spectre infrarouge IRFT de dextrine dans le KBr.	119
Figure IV.23	Spectre infrarouge IRFT du PEG dans le KBr	120
Figure IV.24	Spectre infrarouge IRFT de l'extrait EG après évaporation dans le KBr.	120
Figure IV.25	Spectre infrarouge IRFT des microcapsules de l'extrait EG dans le KBr.	121
Figure IV.26	Spectre infrarouge IRFT de la poudre de EG Dans le KBr.	121
Figure IV.27	Spectre infrarouge IRFT du résidu de macération dans le KBr	122



Listes des tableaux

Chapitre I

Synthèses bibliographiques sur la plante Punica granatum L

Partie 1 : Généralité sur la plante Punica granatum L

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau I.1.1	Classification botanique du grenadier.	05
Tableau I.1.2	Composition fruit de grenades en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100g de la partie comestible di fruit).	10
Tableau I.1.3	Composition chimique du fruit de la grenade	13

Partie 2 : Utilisations de Punica granatum L

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau I.2.1	Utilisation des différents organes du grenadier en médecine traditionnelle.	23
Tableau I.2.2	Activités biologiques des composés phénoliques.	25
Tableau I.2.3	Principales ERO radicalaires et non radicalaires.	30
Tableau I.2.4	Principaux systèmes de production des EOA.	31

Chapitre II

Micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

Partie 1 : Micro-encapsulations et la cinétique

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau II.1.1	Application de la micro-encapsulation dans l'industrie.	50
Tableau II.1.2	Objectif de la micro-encapsulation.	51

Partie 2 : Méthodologie des plans d'expériences

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau II.2.1	Exemples de plans d'expériences.	65



Chapitre III

Matériels et méthodes

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau III.1	Référence et origine de l'échantillon étudié.	70
Tableau III.2	Les dilutions de la solution mère d'AG.	78
Tableau III.3	Préparation des étalons de Quercétine.	80
Tableau III.4	Les dilutions de l'huile essentielle.	82
Tableau III.5	Les différentes masses de PEG, de dextrine et volumes d'extrait brut d'écorces de grenade utilisées pour les essais du plan d'expérience factoriel.	87
Tableau III.6	Variables codées et réelles des facteurs.	88
Tableau III.7	Matrice du plan d'expérience factoriel pour les essais de micro-encapsulation de l'extrait brut de l'écorce de grenade dans les polymères Dex/PEG.	88
Tableau III.8	Temps et le volume de la cinétique de libération de principe actif.	92

Chapitre IV

Résultats et discussion

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau IV.1	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les extraits des écorces de Punica Granatum.	97
Tableau IV.2	Les temps de rétention et aires des pics chromatographiques des standards par HPLC.	98
Tableau IV.3	Temps de rétention et les aires des pics des métabolites secondaires identifiés dans les extraits par HPLC.	99
Tableau IV.4	Concentration des extraits d'écorce de grenade par HPLC.	99
Tableau IV.5	Plan factoriel à 2 niveaux, 3 facteurs -2 réponses et taux d'encapsulation en polyphénols et en flavonoïdes des microparticules obtenues par double émulsion E/H/E.	103
Tableau IV.6	Analyse statistique de la variance pour la réponse EEP%.	105
Tableau IV.7	Analyse statistique de la variance pour la réponse EEF%.	110



Listes des tableaux

Tableau IV.8	Taux de libération des polyphénols et flavonoïdes et l'inhibition de radical DPPH en fonction du temps des microparticules de l'extrait brut de Punica Granatum dans Dextrine / PEG dans le tampon à pH= 6.8.	118
Tableau IV.9	Bandes d'absorption IR des liaisons chimiques caractéristiques de composés identifiés dans l'extrait brut des écorces de Punica granatum, des microcapsules de l'extrait par rapport aux références standards et des réactifs de micro-encapsulation.	122

Sommaire





Sommaires

Introduction.....01

Chapitre I

Synthèses bibliographiques sur la plante *Punica granatum* L

Partie 1 : Généralité sur la plante *Punica granatum* L

I.1.1. Généralité sur les plantes médicinales.....03

I.1.2 Généralité sur la famille des Lythraceae.....03

I.1.3. Historique.....03

I.1.4. Nomenclature.....04

I.1.5. Répartition géographique de grenade.....05

I.1.6. Classification botanique.....05

I.1.7. Description morphologique.....06

I.1.8. Les variétés de grenade.....09

I.1.9. Composition chimique.....10

I.1.10. Les compositions phytochimiques.....12

I.1.11. Les métabolismes.....14

I.1.12. Les compositions phénoliques.....15

I.1.13. Les huiles essentielles.....20

Partie 2 : Utilisations de *Punica granatum* L

I.2.1. Effets thérapeutiques de *Punica granatum*.....22

I.2.1.1. Usage empiriques et traditionnels de la grenade.....22

I.2.1.2. Les activités biologiques du *Punica Granatum* L.....24

I.2.1.3. Les radicaux libres.....28

I.2.1.4. Le stress oxydant.....33

I.2.1.5. Les antioxydants.....38



Chapitre II

La micro-encapsulation et la cinétique de libération du principe actif

Partie 1 : La Micro-encapsulation et la cinétique

II.1.1. Notion essentielle sur les médicaments.....40

II.1.2. La capsule.....41

II.1.3. La micro-encapsulation.....42

II.1.4. Techniques d'encapsulations.....44

II.1.5. Application de la micro-encapsulation.....49

II.1.6. Objectif de la micro-encapsulation.....51

II.1.7. Principe de la pharmacocinétique.....52

II.1.8. Les modèles cinétiques de libération des substances actives.....53

II.1.9. Mécanisme de relargage du principe actif dans les systèmes à libération prolongé.....55

II.1.10 : Profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules.....60

II.1.11. Différentes voies d'administration des médicaments.....60

Partie 2 : Méthodologie des plans d'expériences

II.2.1. Définition.....62

II.2.2. Facteur.....62

II.2.3. Réponse.....63

II.2.4. Construction du plan d'expériences.....63

II.2.5. Terminologie.....63

II.2.6. L'intérêt des plans d'expériences.....64

II.2.7. Notation des plans d'expériences.....64

II.2.8. Types des plans d'expériences.....64



Chapitre III

Matériels et méthodes

III.1. Matériel végétale.....	70
III.1.1. Cueillette.....	70
III.1.2. Prétraitements de l'échantillon.....	71
III.2. Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes.....	73
III.2.1. Extraction par macération dans l'éthanol aqueux (extraction solide/liquide)	73
III.2.2. Extraction par solvant (Extraction liquide / liquide)	75
III.2.3. Analyse quantitative par spectroscopie UV visible.....	78
III.2.4. Activité antioxydant par méthode de DPPH.....	81
III.2.5. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC...	83
III.3. Micro encapsulations.....	84
III.3.1. Présentation des matières premières.....	84
III.3.2. Préparation des milieux physiologiques.....	86
III.3.3. Optimisation des paramètres de préparation des microparticules.....	87
III.3.4. Mode opératoire de la préparation de la micro encapsulation.....	88
III.3.5. Techniques de caractérisation.....	90
III.4. Etudier la cinétique de libération.....	91
III.4.1. Les matériels utilisés.....	91
III.4.2. Préparation des milieux physiologique.....	91
III.5. Caractérisation par infrarouge IRFT.....	92

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV.1. Extraction.....	93
-----------------------	----



IV.1.1. Calcule du rendement massique.....	93
IV.2. Etude phytochimique.....	93
IV.2.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible.....	93
IV.2.2. Activité antioxydante par la méthode de DPPH.....	96
IV.3. Caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	98
IV.4. La micro-encapsulation.....	103
IV.4.1. Réalisation des essais et analyse statistique.....	103
IV.5. Etude de libération in vitro des principes actifs de l'extrait de Punira Granatum encapsulés dans les microparticules de PEG / Dextrine.....	115
IV.5.1. Profil de libération dans le milieu intestinal.....	115
IV. 6. Caractérisation par IRFT.....	118
Conclusion	125
Perspective.....	127
Références Bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

Introduction





Introduction

L'utilisation des plantes médicinales et des préparations à base de plantes connaît un succès croissant dans le domaine de la médecine traditionnelle [1]. Les substances naturelles d'origine végétale sont dotées de diverses activités biologiques, telles que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse et antimicrobienne [2]. Ces propriétés ont conduit à un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales spécifiques, notamment l'écorce de grenade.

Le concept de "stress oxydant" est au centre de l'intérêt des sciences biologiques et médicales. Il fait référence à une situation où les cellules perdent leur capacité à contrôler la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses maladies, telles que le diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, en tant que facteur déclenchant ou associé aux complications. Les radicaux libres attaquent les biomolécules, comme les protéines, les lipides et l'ADN, conduisant à leur dégradation et à la mort cellulaire [3].

Le grenadier, également connu sous le nom scientifique de *Punica granatum*, est une plante médicinale de la famille des Lythraceae ou Punicaceae. L'écorce de grenade est particulièrement intéressante en raison de sa teneur élevée en composés phénoliques, en particulier les acides ellagiques et les punicalagins, qui sont connus pour leur activité antioxydante [4].

La micro-encapsulation est une technologie de pointe utilisée dans l'élaboration de produits pharmaceutiques. Elle consiste à encapsuler un principe actif dans une matière inactive pour améliorer sa conservation, sa présentation et sa biodisponibilité. Les microsphères contenant les principes actifs de l'écorce de grenade, tels que l'acide gallique et l'acide ellagique, présentent un potentiel thérapeutique prometteur dans le traitement des maladies cardiovasculaires [5].

Dans cette étude, notre objectif est de mettre en œuvre l'extraction et l'identification des principes actifs de l'écorce de grenade, en utilisant différents solvants et techniques d'analyse. Nous évaluerons également leur activité antioxydante en utilisant la méthode du radical DPPH. Ensuite, nous préparerons des microsphères contenant ces principes actifs par



le procédé de double émulsion et étudierons leur cinétique de libération de principe actif dans le milieu physiologique $\text{pH}=6.8$.

Nous adopterons une approche basée sur un plan factoriel à 3 facteurs pour étudier les effets de la dose de principe actif, du rapport massique des polymères et du pH sur les taux d'encapsulation en polyphénols et en flavonoïdes. Cette modélisation et optimisation nous permettront d'évaluer les effets de ces paramètres et de prédire les conditions optimales pour l'encapsulation des principes actifs [6].

Ce modeste travail a été partagé en quatre chapitres :

- Le premier chapitre est consacré essentiellement à la revue bibliographique relative aux composés phénoliques de l'écorce de grenade.

- Le deuxième chapitre englobe les effets thérapeutiques sur des maladies cardiovasculaires et le stress oxydant.

- Le troisième chapitre présente les matériaux et méthodes utilisés pour l'extraction des principes actifs, la micro-encapsulation par double émulsion, ainsi que l'étude de la cinétique de libération du principe actif.

- Enfin, Dans le dernier chapitre, nous avons discuté et interprété les résultats obtenus concernant le rendement de l'extraction et le taux d'encapsulation. Nous avons également abordé la modélisation et le contrôle statistique de la réponse prédite, suivie de l'étude de la cinétique de libération in Vitro.

*Chapitre I : Synthèses Bibliographiques
sur la plante Punica granatum*





Chapitre I

Synthèses bibliographiques sur la plante *Punica granatum L*

Partie 1 : Généralité sur la plante *Punica granatum L*

I.1.1. Généralité sur les plantes médicinales

Les plantes sont utilisées dans toutes les cultures, en raison de leurs effets médicinaux. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé « O.M.S » n'estime que la médecine traditionnelle ne couvre pas les besoins de soins en termes de santé primaires avec un pourcentage de 80% de la population mondiale [7].

La préparation et l'utilisation d'extraits de plantes médicinales sont transmises d'une génération à une autre. Ce sont des pratiques empiriques, basées sur des connaissances ancestrales, ignorant ainsi la manière dont ces extraits agissent sur le corps humain. Avec la révolution scientifique et tous les progrès des domaines (médecine, pharmacie, biologie, botanique, pharmacologie, toxicologie...) les cibles et les mécanismes moléculaires des extraits végétaux sont mieux clarifiés.

La flore algérienne se caractérise par sa diversité florale : flore méditerranéenne, saharienne et paléo tropicale, avec plus de 3000 espèces estimées appartenant à plusieurs familles végétales. Ces espèces sont pour la plupart spontanées, avec un nombre important (15%) d'espèces endémiques. Cela confère à la pharmacopée traditionnelle une richesse incommensurable. Les objectifs fixés étaient un inventaire des plantes médicinales en Algérie et une évaluation chimique et pharmaceutique dont leurs buts est de renforcer ainsi que rationaliser leurs usages traditionnels et d'isoler des composées d'intérêts thérapeutiques [8].

I.1.2. Généralité sur la famille des Lythraceae

La famille des Lythraceae est une famille des plantes dicotylédones qui compte 620 espèces. Ce sont des arbres ou des vivaces ou annuelles, dont certaines sont aquatiques. Les Lythraceae ligneuses n'existent qu'entre les tropiques ou en zone méditerranéenne comme le grenadier (*Punica granatum L*) [9].

I.1.3. Historique

Le terme grenade vient du latin « malum granatum » qui signifie : « fruit à petits grains ». En latin pomus et granatus, signifie une tête de série ou de pomme granulaire [10].



La grenade est originaire de l’Iran aux vallées de l’Himalaya en Inde il y a 5000 ans. Elle fût disséminée à travers le Moyen-Orient par les migrants. En effet sa facilité de conservation et sa grande teneur en eau en fit une nourriture de voyage très adaptée [11].

Il a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle en Amérique, en Asie, en Afrique et en Europe pour le traitement de différents types de maladies. Il est disséminé par les nomades arabes, puis introduit en Chine au début du II^{ème} siècle avant JC, le grenadier est importé à Rome par les Romains de retour des guerres puniques, après leur victoire sur les carthaginois [12].

Les Egyptiens, au VIII^{ème} siècle avant JC, connaissaient les effets vermifuges de l’écorce de grenade. Les médecines traditionnelles égyptiennes la considéraient comme anthelminthique et mettaient à profit l’effet astringent du tanin contenu dans l’écorce, la fleur et le fruit du grenadier [9].

Hippocrate (460-377 av. J-C.) surnommé le père de la médecine recommandait la grenade contre les leucorrhées, pour favoriser « l’écoulement rouge » chez les femmes, pour « faire concevoir », pour soigner un œil qui pleure et qui est douloureux, et pour beaucoup d’autres maux. Un peu plus tard, D’après Dioscoride, médecin grec né vers 40 après JC, si l’on mange trois fleurs de grenadier, même de petite taille, on ne souffrira pas des yeux de toute l’année [12].

I.1.4. Nomenclature

- Nom scientifique : *Punicagranatum*.
- Nom français : grenadier.
- Nom anglais : pomegranate.
- Nom espagnol : Granado.
- Nom Italien : Melograno.
- Nom arabe : Roman.

Figure I.1.1: Fleur et fruit de grenade [13].





I.1.5. Répartition géographique de grenade

I.1.5.1. Dans le monde

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

Cependant, l'Espagne, l'Égypte et Israël ont une superficie comprise entre 16 000 et 2400Ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés [14].

D'autres pays pratiquent également cette culture notamment Afghanistan, Pakistan, Arménie, Géorgie, Tadjikistan, Jordanie, Italie, Tunisie, Azerbaïdjan, Libye, Liban, Soudan, Myanmar, Bangladesh, Mauritanie, Chypre et Grèce [15].

I.1.5.2. En Algérie

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenade, de qualités très différentes. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petites jardins en Kabylie, on ne connaît que leur appellation locale (Lahlou, Elmouze...). Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat [16].

I.1.6. Classification botanique

Le grenade, *Punica granatum L*, a été décrit par Carl Von Linné et introduit dans sa classification en 1753. Cette classification encore adoptée et décrite dans le tableau N°02 [17].

Tableau I.1.1: Classification botanique du grenadier [17].

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae (Lythraceae)
Genre	Punica
Espèce	<i>Punica granatum</i>



I.7. Description morphologique

La grenade (en allemand 'pommeavecdesgrains') provient d'un arbre adulte à feuilles caduques ou d'un arbuste à feuilles lancéolées. Ce dernier atteint entre 5 et 10 mètres de hauteur et vit jusqu'à 200 ans. Il est touffu, très ramifié depuis la base du tronc et plus ou moins épineux. Le tronc est tortueux, à écorce grisâtre qui se ramifie en branches irrégulières, légèrement épineuses au sommet [18] (**Figure I.1.2 « A »**).

Figure I.1.2: « A » Le grenadier, « B » Les feuilles, « C » Les fleurs du grenadier.



Il fleurit au printemps et en été en rouge corail. Les fruits savoureux bruns-rouges ont la forme d'une pomme qui serait dotée d'une couronne formée de sépales. Les grenades font partie des baies dans la mesure où leur chair n'est ni charnue, ni ligneuse. Leur peau durcie renferme des compartiments remplis de graines anguleuses. Les fruits ont leur place en cuisine. On peut les manger frais ou les boire sous forme de cidre (**Figure I.1.2 « A »**).

I.1.7.1. Les feuilles

La naissance des nouvelles feuilles du grenadier se déroule assez tard vers la fin avril sur des rameaux à l'écorce beige argenté. Elles sont de forme oblongue, luisante, étroite, entière et non stipulées, des 3 à 7 cm de long et de 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 grenadier ont des feuilles en paires traversant alternativement à angle droit, alors que certaines variétés peuvent avoir trois feuilles par nœud (disposés à 120°) et même quatre feuilles par nœud (deux feuilles opposées par nœud) [18] (**Figure I.1.2 « B »**)



I.1.7.2. Les fleurs

Les fleurs du grenadier (ou balaustes) sont très ornementales de couleur rouge pourpre ou grenat émergent du calice, sorte de « coque » d'aspect cireux, entre les mois de mai et août. Elles ont un aspect froissé et chiffonné [18] (**Figure I.1.2 « C »**).

Le calice est formé de 4 à 8 sépales courts, charnus, épais, d'une belle couleur rouge vif, persistantes, 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 d'un rouge orangé vif, mais pouvant prendre de nombreuses autres teintes selon les variétés, tel que blanc, jaune pâle, crème ou saumon. Ils ont un aspect chiffonné. Ainsi, le gynécée est formé de 8 ou 9 carpelles soudés au tube du calice, disposés sur deux verticilles. L'ovaire, infère, 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.

I.1.7.3. Les fruits

La grenade, fruit du grenadier, en forme de pomme, passant 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 sont contenus de nombreux arilles. Chacun est constitué d'une graine (ou pépin) entourée de jus translucide contenu par une très fine membrane. Les arilles sont rencontrés dans des loges séparées par de minces membranes qui s'étendent à l'intérieur du fruit, donnant au niveau du péricarpe et constituant ainsi une base pour l'attachement des arilles [19] (**Figure I.1.2**). Le fruit donne donc naissance à trois parties bien distinctes : les graines (environ 3% du poids du fruit) qui contiennent aux-mêmes 20% d'huile, le jus (environ 30% du poids du fruit) et la peau qui comprend également les membranes intérieures, dont la composition phytochimique est détaillée dans les paragraphes suivants [20].

Figure I.1.3: La grenade.



A : La baie



B : Les graines



C : L'écorce séchée



La grenade est un fruit d'hiver, elle est cueillie de septembre à décembre. C'est un fruit non climactérique, il ne contient pas à mûrir après la cueillette. On la trouve d'octobre à février, elle peut être stockée pendant 4 mois dans un local frais dont la température se maintiendra aux alentours de 5°C, elle peut être conservée à température ambiante d'une à deux semaines et pendant un mois dans le bac du réfrigérateur, la grenade ne supporte ni congélation ni conserve [20].

a. La baie

Le fruit du grenadier, la grenade est une baie ronde, cortiquée, c'est-à-dire à épicarpe cutinisé et dur, de la taille d'une pomme ou d'une orange de 2 à 12 cm de diamètre. Ce fruit très coloré généralement de couleur rouge vif peut selon les variétés avoir une peau de teinte blanc jaunâtre ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé. Cette baie est surmontée des restes du calice formant une couronne dentée qui la rend facilement identifiable [21]. Son péricarpe, coriace et épais, est non comestible, il forme une écorce dure d'un beau jaune à l'intérieur du fruit [22] (**Figure I.1.3 « A »**).

La grenade présente une placentation hétérogène, après fécondation de la fleur l'accroissement du tube du calice porte les carpelles externes au-dessus des autres, et le fruit se trouve composé de deux rangées de loges superposées de telle sorte que dans la rangée inférieure de la placentation est axile tandis qu'elle est pariétale dans la rangée supérieure [18].

b. Les graines

Cette baie renferme de nombreuses graines contenues dans des loges séparées par des cloisons ténues et membraneuses. En tout il y a à peu près 400 graines dans chaque fruit. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux acidulé et sucré représentant la partie comestible du fruit [22]. Les graines au tégument externe pulpeux et très succulent possèdent un tégument interne dur et coriace. Ces multiples graines courtement funicules deviennent plus ou moins anguleuses par compression réciproque, l'embryon, exalbuminé est formé d'une courte radicule et de deux larges cotylédons auriculés enroulés en spirale l'un sur l'autre. (**Figure I.1.3 « B »**).

c. L'écorce

L'écorce de la grenade (oumalicorium) est la partie dure du fruit, elle est généralement utilisée séchée sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur un peu verruqueux brillants jaunâtres sur la face intérieure concave portant souvent l'empreinte des



graines qui y étaient appliquées, la saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente. (Figure I.1.3 « C »).

I.1.8. Les variétés de grenade

Une multitude de variétés est cultivée, soit pour la beauté des fleurs soit pour les fruits. Le grenadier nain est un petit buisson qui atteint une hauteur d'à peu près un mètre. Il est utilisé comme plante ornementale, certaines variétés ornementales ont des fruits violets à presque noirs qui sont extrêmement acides, ce qui les rend impropres à la consommation.

Les variétés que nous connaissons pour la consommation en frais ou en jus font partie du groupe des grenades douces (contiennent moins de 0.9% d'acide citrique) ou aigre douces (1 à 2% d'acide citrique). Il existe des variétés acides (contiennent plus de 2% d'acide citrique), utilisées notamment pour l'extraction d'acide citrique.

En effet, il existe plus de 1000 variétés de PUNICA GRANATUM, en effet la taille du fruit, la couleur de l'écorce et des graines la dureté des pépins la teneur en jus, l'acidité et l'astringence ainsi que la période de maturation sont les critères les plus utilisés pour les distinguer [23] :

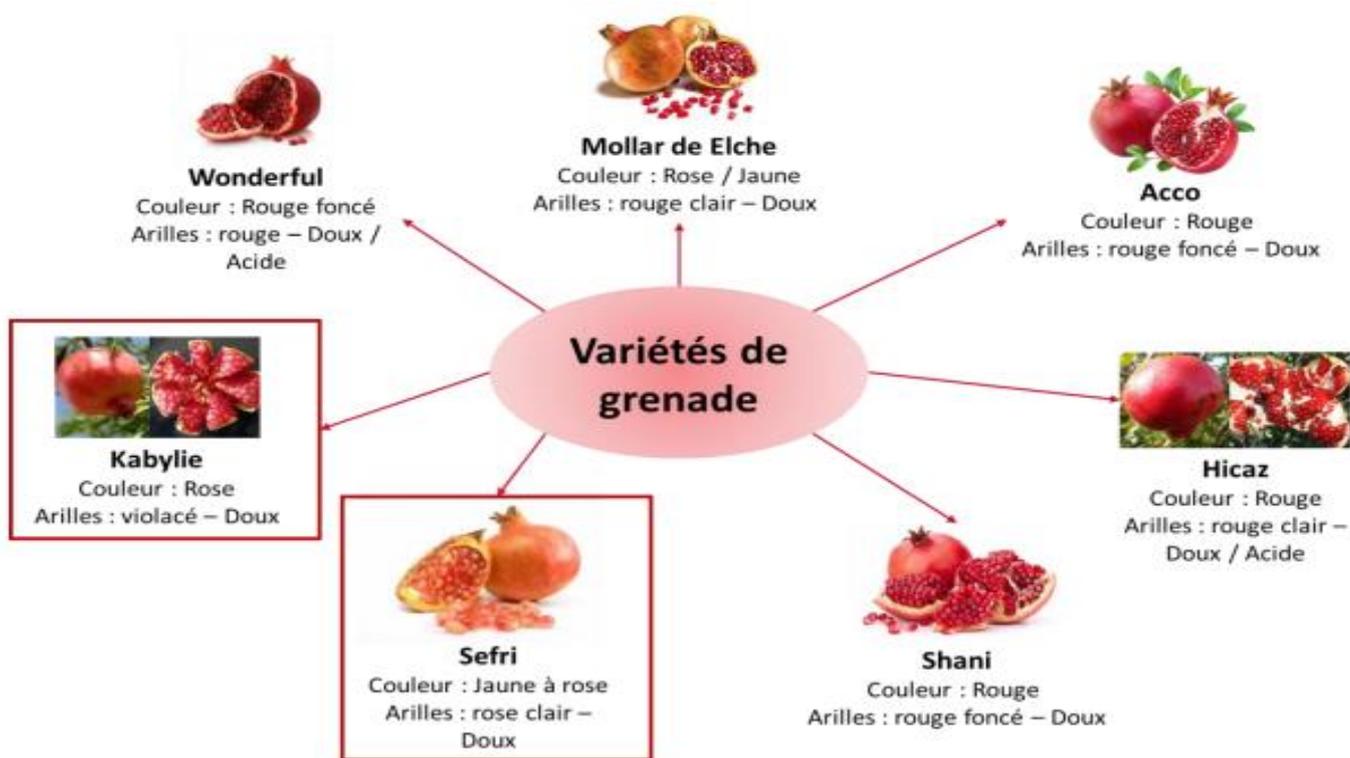
- ✓ Couleur de la peau : du rouge foncé au jaune pâle rosé
- ✓ Couleur des arilles : du rouge très foncé au rose transparent (peu commercialisé)
- ✓ Goût des arilles : acide ou doux

A l'heure actuelle, aucune différence entre les variétés au niveau de la taille du fruit ou de caractéristiques agronomiques n'a été mise en évidence. Selon leurs caractéristiques sensorielles et leur teneur en sucre et acide, les grenades sont aussi classées en trois groupes variétaux : sucrées, aigres-sucrées et aigres [24].

Les principales variétés dans le marché mondial sont : Wonderful, Mollarde Elche, Acco, Hicaz et Shani. Les deux principales variétés produites en Algérie sont : Sefri et Kabylie [25].



Figure I.1.4 : Principales variétés de grenade dans le monde et en Algérie [25].



I.1.9. Les compositions chimiques

I.1.9.1. Le jus de grenade

Le jus de grenade comme de nombreux autres jus de fruits se compose de sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose et d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide malique, l'acide oxalique et l'acide tartrique. Le tableau I.3. Montre les valeurs minimales et maximales obtenues pour les acides organiques et les sucres selon une étude, ont montré que parmi les acides aminés trouvés dans la grenade il y a la valine, proline, méthionine [20].

D'autres études ont montré que le jus a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont le plus important est la vitamine C avec une concentration qui varie entre 4 à 6 mg/100g de portion comestible.

Tableau I.1.2 : Composition fruit de grenades en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100g de la partie comestible de fruit) [13].

	Composé	Quantité (mg/100g)
Acides organiques (Melgarejo et al., 2000)	Acide citrique	0.09 – 0.32
	Acide malique	0.10 – 0.21
	Acide oxalique	0.01 – 0.07
	Acide tartrique	0.01 – 0.05



	Acide fumarique	0.01
Sucres (Melgarejo et al., 2000)	Fructose	5.54 – 8.24
	Glucose	5.53 – 7.80
	Saccharose	0.01 – 0.07
Minéraux et métaux lourds (Codex alimentaire, 2009)	Phosphore	0.30
	Fer	259.00
	Potassium	3.00
	Calcium	3.00
	Sodium	3.00
	Manganèse	0.12
	Magnésium	0.15
	Cuivre	0.07
	Sélénium	0.60
(Codex alimentaire, 2009)	Vitamine B1	0.03
	Vitamine B2	0.03
(Tehranifar et al., 2010)	Vitamine C	9.90 – 17.60

I.1.9.2. Les feuilles

Les feuilles du grenadier contiennent des flavones, telles que la lutéoline et l'api génine. Cette dernière possède des propriétés anxiolytiques. Elles renferment également des tanins, comme la puni câline et l'unicalagine [20].

Figure I.1.5 : Feuilles de Punica granatum [20].





I.1.9.3. Les fleurs

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique [20].

Figure I.1.6 : Fleurs de Punica granatum [20].



I.1.10. Les composition phytochimiques

I.1.10.1. Graine

a. Pépin

Les pépins de grenade contiennent 12 à 20% de matière grasse par rapport au poids de la graine avec une prédominance des acides gras insaturés conjugués avec une teneur de 21,8 – 86,6% d'un acide gras très rare l'acide punique (cis 9, trans 11, cis 13) qui est un iso mère de l'acide linoléique, 0,7 – 24,4% d'acide linoléique, 0,4 – 17,7% oléique, 2,8 – 16,7% stéarique et 0,3 – 9,9% palmitique. 95% des acides gras sont sous forme estérifié, dont 99% de triacylglycérols [26]. Ils contiennent des constituants mineurs de l'huile incluent les stérols et les stéroïdes sexuels [20]. Dont la plus forte concentration en estrone (stéroïdes sexuels du règne végétal) [27].

b. Pulpe (jus)

Le jus de grenade a un pouvoir antioxydant trois fois supérieur au thé vert et vin rouge. Il est riche en vitamine : vitamine C, vitamine E et β -carotène, et en polyphénols : catéchine, acide ellagique, acide gallique et éllagitannins [28]. C'est une source importante en anthocyanines : 3-glucoside et 3,5-diglucoside de delphinidine, cyanidine, et pelargonidine, antioxydants flavonoïdiques puissants, qui lui conèrent sa couleur éclatante, qui augmente en intensité au cours de la maturation. Ainsi que de l'acide citrique et malique et l'acide ascorbique.



Le jus contient des minéraux tels que Fe qui est relativement fréquent, Ça, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Sc, Se, Sn, Sr, et Zn [29].

I.1.10.2. Ecorce de fruit

L'écorce du fruit est très riche en flavonoïdes et en tanins [20]. Il contient environ 25% d'ellagitanin. Et des flavonoïdes tels que : lutéoline, quercétine et puni câlin, sont des ellagitanins spécifiques à la grenade. L'écorce contient aussi des polysaccharides complexes partiellement caractérisés. La présence d'alcaloïdes dans l'écorce est équivoque, positive par le test Dragendorff, mais négative par le test Mayer [25].

I.1.10.3. Feuilles

Les feuilles contiennent les mêmes polyphénols que l'écorce. Elles contiennent aussi des glycosides de l'apigénine, une flavone avec des propriétés progestinique et anxiolytique

I.1.10.4. Fleurs

La composition chimique des fleurs est identique à celle de l'écorce, mais elle n'est pas complètement élucidée. Des études sont en cours afin de déterminer leur effet thérapeutique [25].

I.1.10.5. Racine et écorce de l'arbre

Les extraits préparés à partir des racines et écorce de l'arbre ont de puissants effets physiologiques. Leur composition chimique se distingue des autres parties de l'arbre par de forte concentration en alcaloïdes [20].

Tableau I.1.3 : Composition chimique du fruit de la grenade [5].

Partie du fruit	Compositions
La peau de la grenade (Malicorium)	<ul style="list-style-type: none">○ Acide hydroxybenzoïque : l'acide gallique et l'acide ellagique.○ Acide hydroxycinnamique.○ Dérivés de flavones : molécules de coloration jaune.○ Anthocyanidines : responsables de la couleur rouge des grenades.○ Nombreux ellagitanins : tels que la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la



	<p>granatine B, ces tanins représentent jusqu'à 28% de la peau du fruit.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ La pelletierine pourrait aussi se trouver dans la peau de la grenade.
Le jus de grenade	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sucres : tels que le glucose, le fructose et le saccharose. ○ Acides organiques : l'acide citrique, l'acide ascorbique, l'acide gallique et l'acide ellagique. ○ Acide aminé : la valine, proline et méthionine. ○ Anthocyanines : puissantes molécules antioxydants, fournissant au jus de grenade, sa couleur rouge augmente jusqu'à maturité du fruit, et diminue après la pression du fruit.
Les graines	<ul style="list-style-type: none"> ○ Huile : qui se compose : <ul style="list-style-type: none"> - Acides gras insaturés (80%) : l'acide punique, les acides oléiques et linoléiques et d'autres acides. - Acides gras saturés : les acides palmique et stéarique. ○ Hormones stéroïdiennes, nombreux stérols : le cholestérol

I.1.11. Les métabolismes

L'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans un organisme est appelé « métabolisme » le métabolisme de la plante verte produit avant tous des glucides et de protides. Une fraction de glucide est ensuite transformée en composés divers, dont les lipides sont les plus importants pour la plante. Mais le métabolisme fournit aussi plusieurs corps secondaires que l'homme utilise dans son arsenal thérapeutique, il s'agit des hétérosides, des alcaloïdes, des terpenoïdes, et des composés phénoliques. Les végétaux nous fournissent aussi des vitamines, des oligo-éléments et des antibiotiques [30].

I.1.11.1. Classifications des métabolites

Les réactions chimiques qui ont lieu dans le protoplasme des cellules végétales donnent naissance à deux types de produits : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.



a. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires comprennent de petites molécules telles que les sucres, les acides aminés, les acides tricarboxyliques ou les intermédiaires du cycle de Krebs, les protéines, les acides nucléiques et les polysaccharides. Les métabolites primaires sont similaires dans toutes les cellules vivantes [31].

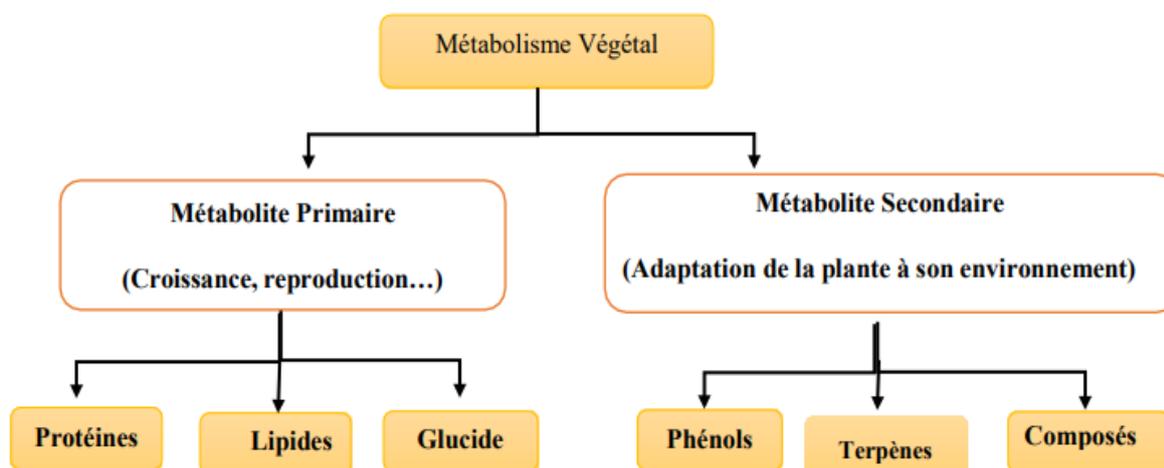
b. Les métabolites secondaires

On appelle métabolites secondaires des composés biosynthétisés naturellement par les végétaux mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal.

Un métabolite secondaire est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire. Les métabolites secondaires sont historiquement plus spécifiques aux plantes, bactéries et champignons, mais on découvre également des métabolismes spécifiques à certains groupes d'animaux [30].

➤ Un schéma explicatif est représenté ci-dessous :

Figure I.1.7 : Schéma global qui résume le métabolisme végétal [30].



I.1.12. Les compositions phénoliques

I.1.12.1. Définition les polyphénols

Les polyphénols dénommés aussi composés phénoliques constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils se trouvent dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ils proviennent du métabolisme secondaire et englobent approximativement 10000 composés naturels identifiés [32].



Les polyphénols, divisés en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun qui est la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside [33].

I.1.12.2. Classifications des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. Ils sont distingués en deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes [34].

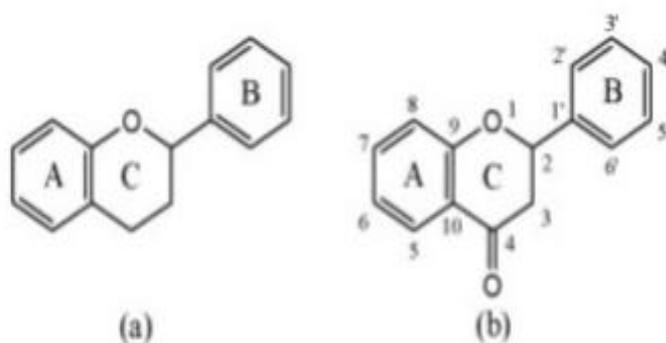
a. Les polyphénols simples

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyranne, formant une structure C6-C3-C6 [35]. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavanols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides [36].

Figure I.1.8 : Motif flavan « a » et flavon « b » et numérotation systématique [36].

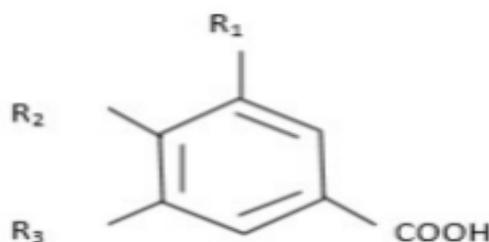




- **Acides phénoliques**

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales principalement dans la grenade qui contient de l'acide gallique et l'acide ellagique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique [37].

Figure I.1.9 : Structure des acides benzoïques [37].



- b. Les polyphénols complexes**

- **Tanins**

Les tanins sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal. Ces composés sont présents dans les racines, feuilles, et grains. La fonction des tanins est le système de défense des plantes contre les microbes et les animaux en raison de leur capacité à former des complexes avec des protéines et des polysaccharides. Les tanins sont une famille de composés polyphénoliques, solubles dans l'eau à base moléculaire [38].

Les tanins sont de grandes structures d'acides polyphénoliques hydrosolubles qui jouent un rôle important dans la régulation et la protection de la croissance des plantes. Une propriété importante des tanins est leur capacité de former des complexes insolubles avec des acides aminés, des glucides et des acides nucléiques, et les alcaloïdes.

Les tanins sont des polyphénols végétaux de haut poids moléculaire divisés en 3 groupes chimiquement et biologiquement distincts : proanthocyanidines (que l'on trouve dans le thé, les raisins, les canneberges), et des tanins hydrolysables (comme dans les framboises et les fraises) [39].

- **Les saponines**

Les saponines sont des métabolites secondaires naturels découverts pour la première fois dans de nombreuses plantes supérieures (par exemple, l'arbre à savon *Quillajasaponaria*) [40].



Les saponines sont des molécules composées de deux entités : une génine (aussi appelée aglycone) et une fraction glycoside, peut être composée d'un seul sucre ou d'une seule chaîne. De sucre qui peut être linéaire ou ramifiée [41].

Structurellement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être soit stéroïdique, soit triterpénique. Dans les plantes, elles interviennent dans les systèmes de défense. Les saponines sont également présentes dans des plantes sous une forme biologiquement active et participent à la phyto-protection antimicrobienne. Les saponosides ont été déterminés par le test de mousse ; degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante après agitation [42].

- **Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont inégalement répartis parmi les plantes, et varient qualitativement et quantitativement au sein des organes végétatifs d'une même plante. Ils sont produits dans un organe, tissu ou type cellulaire spécifique à des stades particuliers du développement de la Fleur, du fruit, de la graine ou de la plantule. Ils sont souvent synthétisés dans une partie de la plante et stockés dans une autre [43].

Les alcaloïdes sont dérivés des acides aminés par exemple le Tryptophane, l'Ornithine, la Lysine, l'Asparate, l'Anthranilate, la Phénylalanine et la Tyrosine [44].

Les alcaloïdes, enfin, abondent dans les tissus particulièrement actifs : régions de croissance, points végétatifs, zones de cicatrisation, bourgeons qui s'ouvrent, ovaires et ovules qui mûrissent. On trouve les alcaloïdes, dans les Angiospermes, les Gymnospermes, les Cormophytes les moins évolués (Bryophytes, Ptéridophytes) et parmi les Thallophytes.

Les alcaloïdes ont des masses moléculaires variables, mais relativement faibles. Ils sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques sauf la morphine et la cincochine. Ils jouent un rôle de défense contre les herbivores grâce à leurs goûts amers caractéristiques et leurs toxicités [45].

Figure I.1.10 : Quelques exemples d'alcaloïdes.



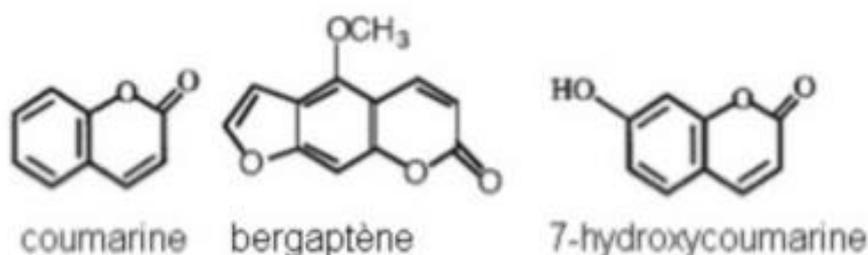


- **Les coumarines**

Les coumarines naturelles sont des métabolites secondaires synthétisés par les feuilles Des plantes. Elles sont sous forme d'hétérosides et différemment réparties dans les différentes parties d'une même plante [46].

Ceux sont des hétérocycles oxygénés, dans les plantes, on les rencontre dans les Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Rosaceae, Rubiaceae et Solanaceae. Du point vu structurai, on les classe en coumarines simples [47].

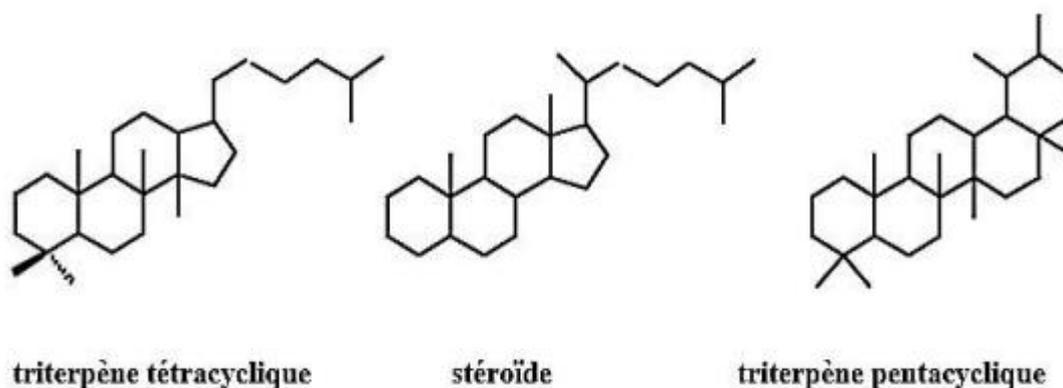
Figure I.1.11 : Quelques exemples de coumarines



- **Les terpénoïdes**

Les terpènes (terpenoïdes ou isoprénoïdes) constituent le plus grand groupe des métabolites secondaires (~50.000 substances identifiées). Leur nom provient de la terpentine, cire de pin. Ce sont des hydrocarbures (C₅H₈) retrouvés principalement chez les plantes, mais aussi chez les insectes, les bactéries, les champignons et les algues. Ils sont contenus dans les huiles essentielles, les résines, les cires et latex [48].

Figure I.1.12 : Quelques structures des terpènes [48].





- **Les Anthocynes :**

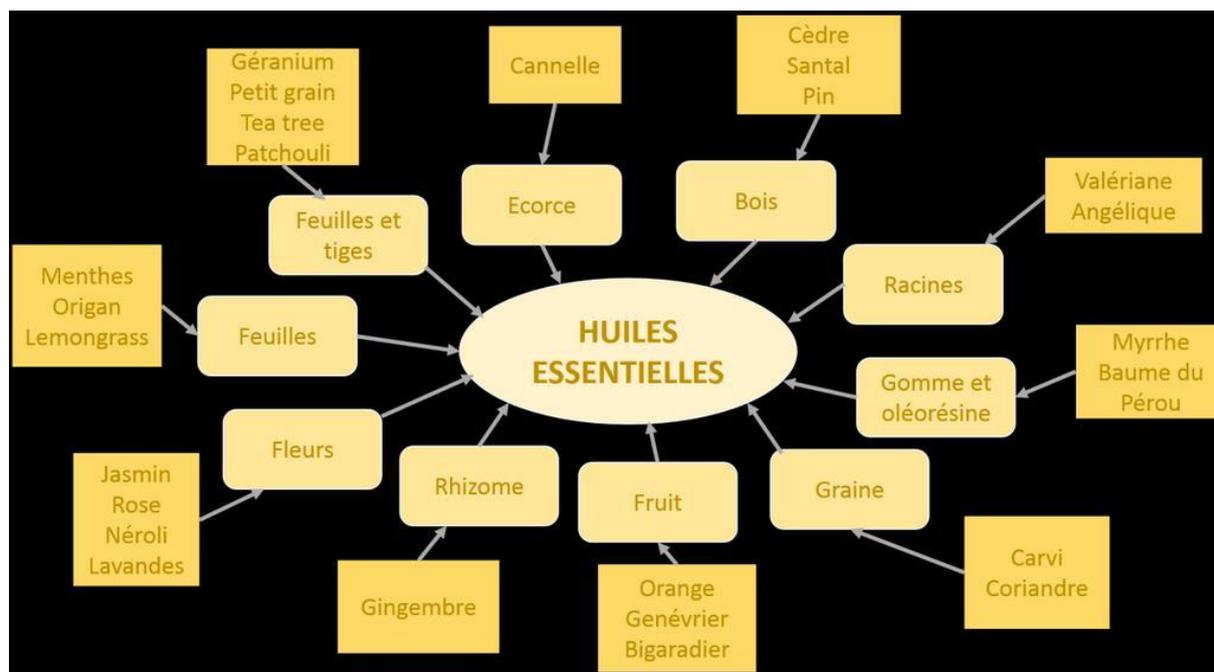
Les anthocyanes du grec antos fleur et kuanos bleu violet, capables d'absorber la lumière visible, colorent les plantes en bleu, rouge, rose ou orange. Les anthocyanes sont habituellement caractéristiques des pétales des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues. Elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques [45].

I.1.13. Les huiles essentielles :

I.1.13.1. Définition :

Un huile essentielle appelée aussi essence est un mélange de substance aromatiques volatiles peu complexe issue et produit par les plantes utilisées comme moyen de défense contre les Ravageurs phytopathogènes [49].

Figure I.1.13 : Les d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes.



I.1.13.2. Méthodes d'obtention des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction comme l'hydro distillation, l'expression à froid, l'enfleurage, l'extraction par solvants organiques, l'extraction par ultra-sons ...etc. Dans ce cas on a eu recours à la méthode d'extraction par hydro distillation.

L'extraction des huiles essentielle par hydro distillation est réaliser par un appareil de Type Clevenger. Il comprend un ballon de capacité de deux litres contenant de l'eau



Bouillonnante en contact direct avec la matière végétale. Ce ballon est connecté à un Réfrigérant qui sert à condenser la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle extraite, le distillat est récupéré dans un ballon ou un erlen [49].

I.1.13.3. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont aujourd'hui omniprésentes dans notre quotidien : dans des produits cosmétiques, dans des produits d'hygiène ou dans des parfums d'ambiance, dans des huiles aromatiques destinées aux massages bien-être, ou encore commercialisées sous forme de complexes visant à purifier notre air pollué. Elles trouvent également un intérêt grandissant auprès de l'industrie et de l'agroalimentaire.

On estime à environ 3000 le nombre d'huiles essentielles connues et autour de 300 celles ayant un intérêt commercial, principalement pour l'industrie du parfum et des arômes [49].

a. En pharmacie

Le contenu des plantes en essence et la nature chimique des constituants leurs confèrent de grandes perspectives d'application, ces substances sont d'un grand intérêt pour le domaine médicale et pharmaceutique.

En effet, les huiles essentielles ont un champ d'activité très large, elles inhibent la croissance des bactéries, et des levures [50], également des moisissures de plus elles sont très efficaces sur les microorganismes résistants aux antibiotiques [51].

b. En cosmétologie

Le secteur d'hygiène et l'industrie des cosmétiques sont également des consommateurs, la majorité des produits cosmétiques contiennent une quantité de l'huile essentielle comme élément parfumant et aussi élément assurant une odeur agréable [52].

c. En agriculture

Les pesticides naturels basés notamment sur les huiles essentielles représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les adventices et les champignons.

Les huiles essentielles sont utilisées comme agent de lutte biologique dans plusieurs cas y compris le cas de niébé infectée par *Callosobruchus maculatus* [53].



I.1.13.4. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances sensibles et très délicates, ce qui rend leur conservation difficile et obligatoire dans le but de limiter les risques de dégradation, ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons opaques à l'abri de la chaleur et de la lumière [54].

Partie 2 : Utilisations de Punica granatum

I.2.1. Effets thérapeutiques de Punica granatum

I.2.1.1. Usage empirique et traditionnelle de Punica granatum

Le grenadier, connu scientifiquement sous le nom de Punica granatum, est une plante médicinale ancienne utilisée depuis plus de 3000 ans. Ses fruits, graines, écorce et fleurs présentent des propriétés thérapeutiques renommées.

Aussi, il est utilisé, de façon empirique, dans les médecines traditionnelles, pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. Le grenadier fait l'objet, depuis une dizaine d'années, d'un regain d'intérêt, tant sur un plan médical et pharmacologique que sur le plan cosmétologique. En effet, la grenade possède des propriétés antioxydantes supérieures à celles du vin rouge ou du thé vert [12].

a. Utilisations traditionnelles du Punica Granatum L

Le grenadier a traditionnellement été utilisé comme aliment de base, mais ses différentes parties ont également été utilisées en médecine traditionnelle dans de nombreux pays depuis des siècles. Grâce aux connaissances transmises par les générations précédentes, cet arbre offre des possibilités prometteuses pour le développement de nouvelles approches préventives contre diverses maladies. En outre, d'autres utilisations sont également observées, telles que les teintures naturelles, la décoration et les produits cosmétiques [12].

Figure I.2.1: Le grenadier en médecine traditionnelle [12].





Le potentiel thérapeutique des diverses parties du grenadier, telles que les racines, les fleurs, les feuilles et les fruits, a été largement reconnu par la communauté médicale dans de nombreux pays du monde. Leurs utilisations varient d'une région à l'autre en fonction de la partie du grenadier utilisée, qu'elle soit fraîche ou séchée. Le tableau ci-dessous résume quelques utilisations traditionnelles dans la médecine en fonction de la partie spécifique du grenadier utilisée [55].

Tableau I.2.1: Utilisation des différents organes du grenadier en médecine traditionnelle.

Organe utilisé	Fins thérapeutiques	Région / Pays
Fleurs	<ul style="list-style-type: none"> - Anthelminthique et astringent. - Soulager les épistaxis, otites et hémorragies. - Toniques et astringentes. - 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 luvette et des gencives. 	Chine et Egypte
Racines	<ul style="list-style-type: none"> - En décoction pour traiter le ténia, les diarrhées chroniques, les dysenteries chroniques et les pertes blanches ou hémorragiques 	Chine
Feuilles et écorce des Rameaux	<ul style="list-style-type: none"> -Tonique agréable. - La débilité de l'estomac, le manque d'appétit, les nausées, la faiblesse générale, la chlorose, l'anémie, la migraine. 	Chine
Écorce de grenade	<ul style="list-style-type: none"> - Effets vermifuges. - Anthelminthique. -Toniques et astringentes - 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 	Egypte



	relâchement de la luette et des gencives.	
Peau de grenade (malicorium)	- 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.	Chine
Graines de grenade	- Soulager les ulcères atoniques.	Chine
Jus de grenade	- Réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité.	Afrique du Nord et Inde
Suc de grenade	- Rafraîchissant, diurétique, adoucissant.	Chine

I.2.1.2. Les activités biologiques du Punica Granatum L

Des études ont confirmé les activités biologiques du Punica Granatum L., démontrant que la grenade possède des propriétés antidiabétiques, antimicrobiennes, et anti-cancérigènes. D'autres recherches ont révélé que la grenade possède également des propriétés antioxydants et antimicrobiennes qui peuvent prévenir la détérioration des produits alimentaires. Ces résultats justifient l'utilisation de la grenade comme agent de conservation naturel, car il existe actuellement une tendance à remplacer les agents chimiques et synthétiques ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydants par des agents naturels présents dans les fruits, les légumes et les herbes aromatiques [56]. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, qui vise principalement à valoriser l'écorce du fruit de la grenade en étudiant ses propriétés antimicrobiennes et antioxydants.

Les principaux résultats d'une révision bibliographique concernant la littérature scientifique, ou sont décrites les diverses activités biologiques de la grenade qui ont été énoncées ci-dessus.



Tableau I.2.2: Activités biologiques des composés phénoliques [57].

Polyphénols	Activités
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydants
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaroveineux
Proanthocyanidines Antifongiques Anti-inflammatoires	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales
Tannins galliques et cat chiques	Antioxydantes

a. Activités antimicrobiennes

Un antimicrobien est une famille de substances qui tuent ou ralentissent la croissance des microbes. Ces derniers sont de plus en plus résistants aux actuels traitements antibactériens, antifongiques et antiviraux, ce qui pousse les chercheurs à découvrir de nouveaux principes actifs. En effet, l'activité antimicrobienne de la grenade et de ses dérivés a été démontrée dans de nombreuses études qui ont constaté l'inhibition de l'activité de nombreux microorganismes.

L'écorce du fruit de *Punica granatum* démontre une activité antibactérienne in vitro. Cette activité unique est probablement attribuée à la combinaison spécifique de tanins et d'alcaloïdes présents dans cette écorce, ainsi qu'à leur action synergique. Il est intéressant de noter que cette activité antibactérienne n'a pas été observée dans d'autres fruits également riches en tanins et en alcaloïdes [57].

b. Activité antioxydant

L'oxydation qui se produit dans les tissus de notre organisme provoque le vieillissement, la dégénération et bien entendu la maladie. Cependant, notre organisme



possède des antioxydants qui ont la capacité de le protéger contre les radicaux libres, tels les radicaux de l'oxygène et de l'azote ainsi que les radicaux lipidiques.

De nombreux chercheurs ont étudié les composés responsables du puissant pouvoir antioxydant de la grenade et de ses produits dérivés, à la fois dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

L'activité anti-oxydante *in vitro* de la grenade et de ses produits dérivés a été évaluée par plusieurs ont déterminé que la haute capacité anti-oxydante de la grenade et de ses produits dérivés est due à la présence des punicalagines dans sa composition, et non pas aux anthocyanosides. Les mécanismes de l'activité anti-oxydante *in vivo* ne sont pas clairs, mais les scientifiques savaient que ces mécanismes agissent sur les matrices biologiques d'une manière très complexe [58 ; 59].

Des études ont révélé que l'extrait de peau de grenade présente des effets bénéfiques tels que la réduction de la peroxydation lipidique dans les tissus hépatiques, cardiaques et rénaux. De plus, il a été démontré que cet extrait favorise la capacité à neutraliser l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène.

L'extrait méthanoïque de la peau de Punica granatum (grenade) pour son activité antioxydant sur le cerveau des rats mâles adultes albinos Wistar en mesurant les paramètres antioxydants (le glutathion réduit, la catalase, la Superoxydesdismutases, la glutathion réductase, la glutathion-S-transférase, et la glutathion peroxydase), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxyde nitrique (NO) et la peroxydation lipidique (MDA) dans l'homogénat de cerveau. Le traitement avec la peau de grenade a eu comme conséquence l'augmentation marquée de la plupart des paramètres antioxydants avec la réduction des oxydants [59].

c. Prévention contre les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont les maladies qui concernent le cœur et la circulation sanguine. Ainsi, lorsque le taux de cholestérol LDL (low-density lipoprotein) est trop élevé, le risque de ces maladies augmente. Il semblerait que l'oxydation du LDL contribue à l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires [60].

Différentes recherches ont été menées sur des animaux et des êtres humains en utilisant divers produits liés à la grenade afin d'évaluer son impact dans la prévention et la réduction de l'athérosclérose ainsi que de l'oxydation du LDL.



- **Effet hypotenseur**

La grenade est très connue pour l'abaissement de la tension artérielle. Certains antioxydants comme la vitamine C, vitamine E, β -carotène et le coenzyme Possèdent des propriétés hypotenseur.

De nombreux essais cliniques ont été réalisés pour étudier les bienfaits cardioprotecteurs et hypotenseurs de la grenade. Les polyphénols présents dans ce fruit sont responsables de ces effets bénéfiques pour la santé. Cependant, les résultats de ces études varient en fonction des populations testées et du nombre de patients inclus dans chaque étude.

Ainsi, il agit comme protecteur des fonctions endothéliales et de l'athérosclérose. Il améliore la santé cardiovasculaire associée à des traitements conventionnels. Des résultats similaires sont obtenus avec l'huile extrait de ce fruit [61].

- **Effet sur les plaquettes sanguines**

La thrombose joue un rôle crucial dans les maladies cardiovasculaires, étant donné que les plaquettes, qui sont des fragments de cellules sanguines dérivées du cytoplasme des mégacaryocytes de la moelle osseuse, circulent dans le sang. Elles ont un rôle essentiel dans le processus de coagulation sanguine et contribuent à la formation d'un caillot sanguin après une lésion de l'endothélium.

Les plaquettes jouent également un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, et l'augmentation de l'agrégation plaquettaire est associée à l'athérogénicité. Des études récentes ont permis de mieux comprendre leurs fonctions. L'activation plaquettaire attribuable à des Espèces Réactives Oxygénées (ERO) ainsi les antioxydants diminuent l'agrégation plaquettaire [28].

- **Effet sur les lipides sanguins et leur peroxydation**

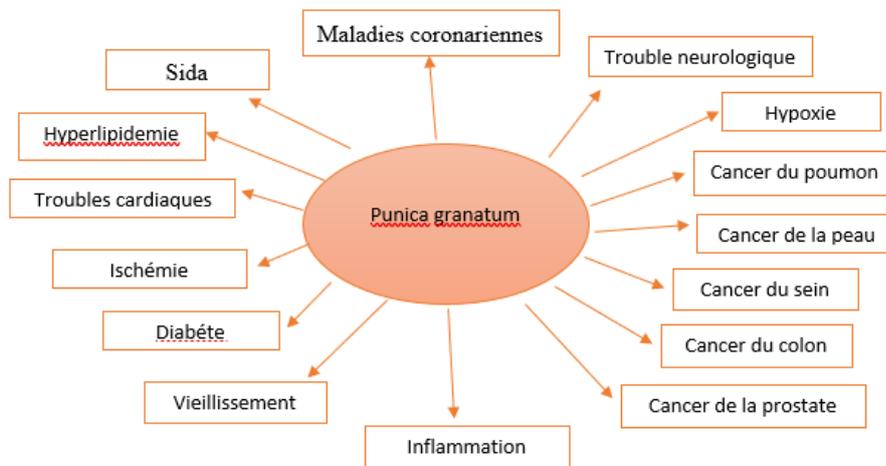
L'écorce de grenade a été étudiée pour son effet sur les lipides sanguins et leur peroxydation. Les résultats de certaines recherches effectuées sur l'écorce de grenade peuvent contribuer à la réduction des niveaux de lipides sanguins, tels que le cholestérol total, le cholestérol LDL ("mauvais" cholestérol) et les triglycérides. De plus, les propriétés antioxydantes de l'écorce de grenade peuvent aider à prévenir la peroxydation des lipides, ce qui est bénéfique pour la santé cardiovasculaire. [62].



- **Inhibition de l'oxydation des LDL**

Les polyphénols de grenade augmentent l'activité paraoxonase sérique, ce qui entraîne l'hydrolyse des peroxydes lipidiques dans lipoprotéines oxydées et dans les lésions athérosclérotique. Ce propriétés antioxydants et antiathérogènes des polyphénols de grenade ont été démontrées in vitro ainsi qu'in vivo chez l'être humain et chez la souris athérosclérotique déficiente en apolipoprotéine [63].

Figure I.2.2: Maladies traitées par Punica granatum [28].



I.2.1.3. Les radicaux libres

a. Histoire des radicaux libres

Au milieu des années 50 que l'oxygène est indispensable à la vie, il est aussi toxique pour l'organisme. S'inspirant de ses travaux, Harman propose la « Théorie radicale du Vieillessement », via la production de radicaux libres (entités chimiques très instables et réactives suite à la présence d'un électron libre dans leur structure). L'oxygène est à l'origine du processus du vieillissement cellulaire.

Pour l'histoire du stress oxydant, les américains McCord et Fridovich séparaient, en 1969, à partir des globules rouges humaines, un système enzymatique antioxydant : le superoxyde dismutase (SOD), qui élimine le radical libre anion superoxyde produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale montre indirectement que les radicaux libres sont produits dans notre corps. Ceci est donc le point de départ de recherches sur les sources de production de l'anion superoxyde et sur ses rôles pathologique et physiologique.

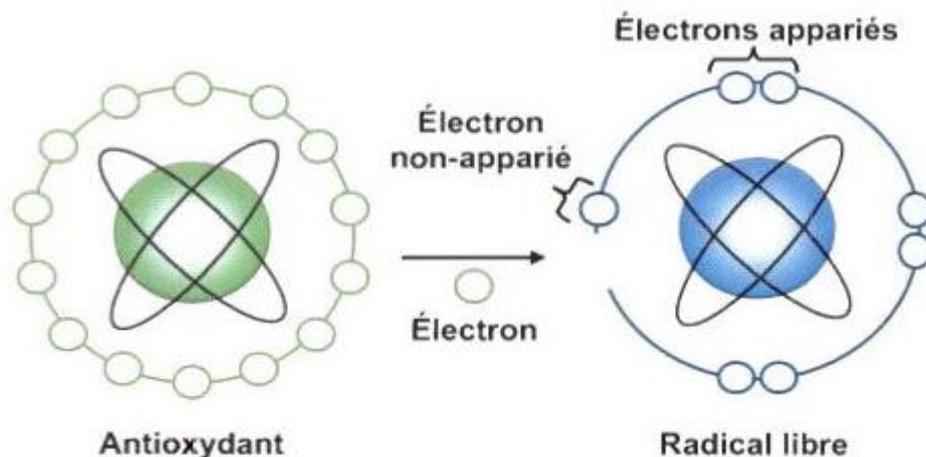


Vers la fin des années 1980, d'autres méthodes plus nécessaires pour l'évaluation des dommages oxydatifs sont apparues au niveau des lipides, de l'ADN ou des protéines. En utilisant toutes ces méthodes, l'efficacité scientifique des molécules antioxydants peut ensuite être testée *in vivo* dans divers modèles de stress oxydatif, chez l'animal et chez l'homme [64].

b. Définition des radicaux libres

L'oxygène est une molécule essentielle à la vie. En tant que source d'énergie, les organismes dits aérobie utilisent des réactions redox (chimiotrophes), impliquant des interactions entre donneurs d'électrons (agents réducteurs) et accepteurs d'électrons (oxydants) [65]. En chimie, un radical libre est un atome ou une molécule contenant un électron non apparié. Ce dés équilibre n'est que transitoire, car il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron, soit par le transfert de cet électron libre vers une autre molécule (**figure II.2.3**) contenant un électron non apparié. Ce dés équilibre dépend principalement de l'instabilité du radical libre considéré. Si cette instabilité est modérée, la probabilité d'accepter un deuxième électron est élevée et dans ce cas, le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydo-réduction classique. Si, au contraire, cette instabilité est élevée, l'électron libre est rapidement transféré vers une autre molécule. Plus l'instabilité est importante, moins la réaction est spécifique. En d'autres termes, l'électron passe sur une molécule non destinée à cet effet [71].

Figure I.2.3 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant [71].



c. Les différentes espèces radicalaires

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobie puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes, transporteurs



d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adénosine Diphosphate) en ATP (Adénosine Triphosphate). Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales :

- En premier lieu, 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à fort potentiel énergétique seront générées lors de la réduction de l'oxygène. C'est la mitochondrie qui donne à la cellule une source considérable d'énergie.
- En revanche, approximativement 0,4 à 4% de l'oxygène ne sera pas correctement transféré en eau, en raison de fuites électroniques aboutissant à des imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'oxygène donne naissance à des espèces oxygénées activées (EOA) par réduction nanoélectronique [66].

Le radical anion superoxyde se forme (**Tableau I.2.3**), ce qui conduit ensuite à la production d'autres EOA tels que le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, le radical hydroxyle, l'acide hypochloreux et le monoxyde d'azote (NO) [67]. Mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde l'hydrogène (H₂O₂) et le peroxyde nitrite (ONOO⁻) [68].

Tableau I.2.3 : Principales ERO radicalaires et non radicalaires [69].

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Radicalaire	Non Radicalaire
<ul style="list-style-type: none">○ Radical superoxyde O₂⁻.○ Radical hydroxyle:OH.○ Peroxyle: RO₂.○ Alkoxyle: RO.○ Hydroperoxyle: HO₂.	<ul style="list-style-type: none">○ Peroxyde dihydrogène : H₂O₂○ Hypochlorite d'hydrogène : HOCl○ Ozone : O₃○ Oxygène singulet : O₁○ Peroxynitrite: ONOO₋

Plusieurs mécanismes biochimiques peuvent s'activer dans l'organisme, mais aussi sous l'action d'éléments environnementaux, en produisant des quantités excessives d'EOA, qui vont donc très vite submerger toutes nos défenses antioxydants [70].

d. Production et origine des radicaux libres

Lors du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, le radical superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$) est produit par réaction de l'oxygène avec un radical semi-ubiquinone dans les mitochondries.

Cependant, il est probable qu'au cours d'une agression cellulaire, les mitochondries seront secondairement endommagées et produiront ensuite des quantités considérables de superoxyde.



Les cellules phagocytaires comportent une enzyme membranaire appelée NADPH oxydase qui est responsable dans la production du radical superoxyde ($\cdot O_2^-$), elle est activée quand la cellule phagocytaire est stimulée. Cette production de superoxyde est à l'origine de la production de molécules, telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite (ClO^-) indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Une enzyme ubiquitaire appelée la xanthine-déshydrogénase est impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Cette enzyme sera modifiée en xanthine-oxydase au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion (**Tableau I.2.4**), qui produit du superoxyde en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine.

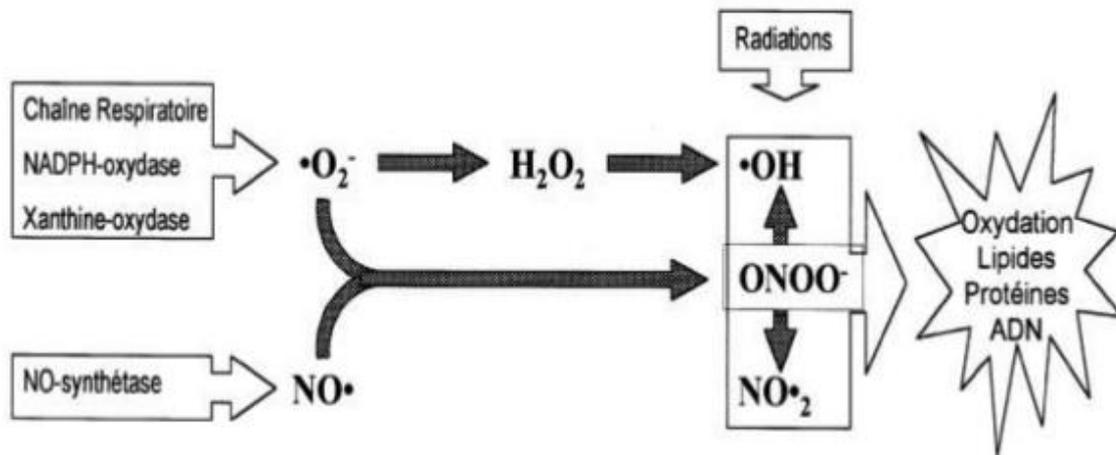
Tableau I.2.4: Principaux systèmes de production des EOA.

Dans l'organisme	Extérieurs à l'organisme
<ul style="list-style-type: none">• Altération du transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (ischémie-reperfusion).• Biosynthèse des prostaglandines (prostanoides et leucotriènes inflammatoires).• Oxydation de l'hémoglobine.• Oxydation du glucose.• Libération du fer de ses protéines de transport.• Agrégation des plaquettes.• Activation des cellules endothéliales.• Activation des globules blancs.• Cythochrome p 450.• Fumée de cigarette.• Alcool.• Médicaments.	<ul style="list-style-type: none">• Exposition au soleil (UV)• Exposition aux irradiations (rayon γ).• Amiante.• Pollution.• Ozone.• Alimentation

Le fer et le cuivre sont des ions métalliques qui transforment le H_2O_2 en radical hydroxyl (OH^\cdot). De nombreuses cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote (NO) à partir d'arginine et d'oxygène dans une réaction catalysée par la NO synthétase. Il existe une deuxième forme de NO synthétase (**Figure I.2.4**), qui produit de grandes quantités de NO^- , à des concentrations élevées, le NO^- devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec un radical superoxyde (O_2^-) pour former un oxydant puissant : le peroxyde d'azote ($ONOO^-$). De plus, le peroxyde d'azote peut se décomposer secondairement en d'autres oxydants (NO^\cdot , OH^\cdot , etc.) [71].



Figure I.2.4: Origine et cibles des principaux dérivés réactifs de l'oxygène [72].



e. Phase de l'oxydation :

Traditionnellement, on décrit l'oxydation en trois phases distinctes, mais pratiquement Simultanées [73].

- **Initiation** : (formations d'hydroperoxydes)

L'oxygène n'oxyde pas directement les molécules, le mécanisme réactionnel initial peut être initié par la chaleur, les UV ou les ions métalliques. De même, l'oxygène triplet, stable, peut être activé en oxygène singulet, réactif, par l'intermédiaire d'une photo sensibilisateur. La phase d'initiation aboutit donc à la formation d'espèces très réactives.

- **Propagation**

- ✓ Destruction des hydroperoxydes et apparition des composés responsables des goûts et odeur de rance.
- ✓ La liaison O-O dans un hydroperoxyde est faible et peut être facilement rompue.
- ✓ Les deux dernières réactions sont en boucles, ce qui explique que des traces d'ions métalliques suffisent à générer une grande quantité de radicaux libres.
- ✓ Les espèces radicalaires produites par les premières réactions sont hautement réactives et vont à leur tour arracher un hydrogène à une autre molécule ou réagir avec un oxygène triplet.

- **Terminaison (arrêt)**

- ✓ Apparition de nouvelles espèces moléculaires anarchiques.



- ✓ La chaîne de propagation peut s'arrêter par la formation de polymères ou au contact avec un autre radical. Les molécules créées n'ont plus de fonction biologique.

I.2.1.4. Le stress oxydant

a. Définition du stress oxydatif

De petites quantités de dérivés réactifs de l'oxygène seront produites par le métabolisme cellulaire en continu. Cette production est fortement élevée dans certaines situations entraînent un stress oxydatif, qui sera défini comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. A cause de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les dérivés réactifs de l'oxygène ont été impliqués dans un nombre important de pathologies. La production de dérivés réactifs de l'oxygène augmente en réponse à toute attaque infectieuse, le développement d'un stress oxydatif incontrôlé a été proposé comme l'un des facteurs secondaires contribuant au mauvais pronostic de ces pathologies [74].

b. Conséquences biochimiques du stress oxydatif

Les ERO qui interagissent avec une variété de substrats biologiques importants sont toxiques. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des ruptures d'ADN et des processus de peroxydation lipidiques peut alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule [67].

- **Effet sur les protéines**

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des radicaux libres. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus, pour conséquence, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire [64].

- **Effets sur les acides gras**

Les scientifiques développent de multiples expériences in vitro dans le sillage de la découverte de la SOD, qui montrent la toxicité des radicaux libres responsables de dommages cellulaires importants, via le déclenchement de ruptures et de mutations au sein de l'ADN,



l'inactivation de diverses enzymes, la modification des structures protéiques ; l'oxydation des sucre et induction de peroxydation lipidique [64].

Le test TBARS (thiobarbiturique réactive substances) a été développé au milieu des années 70, pour la détection du processus de peroxydation lipidique [64] qui est un processus complexe et une large gamme de produits formés en quantités variables [70]. Les cibles préférées des ERO sont les lipides et, plus spécifiquement, les acides gras polyinsaturés. Une fois formés, les lipides oxydés donnent naissance à des sous-produits tels que le malinaldéhyde, le 4-hydroxynonénal, les lipofuschines (pigment d'âge) ou le pentane [68]. La méthode TBARS mesure par colorimétrie le produit de la réaction de l'acide thiobarbiturique avec le malondialdéhyde (MDA), un sous-produit des lipides oxydés. Cependant, le grand nombre d'artefacts associés à la technique la rend peu fiable [64].

- **Effets sur les glucides**

Les radicaux peuvent oxyder les monosaccharides, mais ils peuvent également réagir avec des polysaccharides et induire leur dépolymérisation [75]. Le radical OH est capable de couper les molécules de sucre (désoxyribose, mannose, glucose) et de susciter ainsi des liaisons entre sucres et protéines provoquant des épaissements membranaires. La cataracte diabétique serait une conséquence de cette liaison. Les radicaux de l'oxygène provoquent aussi une fragmentation des polymères comme l'acide hyaluronique, glycosaminoglycane constitué de répétitions d'unités d'acide glucuronique-N-acetylglucosamine et qui maintient la viscosité élevée du liquide synovial. Cependant, dans la polyarthrite rhumatoïde ; il est dépolymérisé ; sous l'effet des ERO générés par les neutrophiles [76].

- **Effets sur l'ADN**

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des ERO. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. L'atteinte de l'ADN implique le franchissement préalable de toutes les barrières de défense mises en place par les végétaux, la potentialité de détoxification des cellules ou de l'organisme et enfin du potentiel des systèmes de réparation de l'ADN de l'organisme. Plusieurs altérations ont été observées : [77]

- ✓ Une formation des bases oxydées.



- ✓ Des sites abasiques qui sont une partie de l'ADN dépourvue d'une base purique ou pyrimidique et ayant perdu l'information génétique par rupture de la liaison entre une base et le désoxyribose.
- ✓ Des cassures au niveau des brins d'ADN.
- ✓ Des pontages « ADN-protéines », les lésions au niveau de l'ADN peuvent également provoquer des aberrations chromosomiques, c'est-à-dire un nombre ou une structure anormale des chromosomes.

c. Les moyens de défense contre le stress oxydatif

Le corps dispose d'un ensemble complexe de défense antioxydants pour se protéger effets nocifs de l'ERO. Il existe deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, l'autre est endogène comprend des enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), des protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et des systèmes de réparation des dommages oxydatifs tels que les endonucléases. A cela s'additionnent des oligo-éléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des facteurs d'enzymes antioxydants [78].

- **Moyens de défense endogène**

- ✓ **Les Superoxydesdismutases (SOD)**

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premiers lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde $O_2^{\circ-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD₁ cytosolique, la Mn-SOD₂ mitochondriale et la Cu/Zn-SOD₃ [64].

Superoxyde dismutase

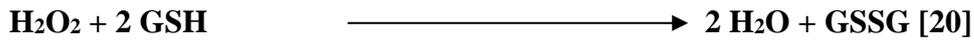


- ✓ **Les Glutathions peroxydases (GPxs)**

La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras, la glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries, elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants : le glutathion réduit et le sélénium [79].



Glutathionperoxydase



- **Le cuivre**

A concentration physiologique, le cuivre est un cofacteur d'enzymes tels que la SOD, le cytochrome C oxydase, la dopamine β -hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle essentiel dans le déclenchement des réactions pour produire les ERO (réactions de Fenton) et peut lorsqu'il est à haute concentration de devenir pro-oxydant. L'apport journalier recommandé est d'environ 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau [80].

- **Le zinc**

Le zinc intervient en tant que cofacteur enzymatique au niveau de la plupart des métabolismes, il contribue à la stabilisation des membranes lipidiques, les tissus en formation étant particulièrement sensibles au stress oxydatif. Il se concentre dans les muscles et les os, mais un apport quotidien est indispensable car l'organisme ne parvient pas à le stocker comme le sélénium, cet oligo-élément est un constituant indispensable à la synthèse d'un antioxydant enzymatique (le superoxyde dismutase). Les viandes, poissons et fruits de mer contiennent des quantités importantes de zinc. Il est également présent dans les œufs, les fruits et légumes secs [81].

- **Sélénium**

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes (constituant indispensable des glutathion-peroxydases), et l'activité biologique antiradicalaire des séléno-protéines.

Les sources de sélénium sont les fruits de mer, les abats, les volailles, et les noix du Brésil. Les végétaux en contiennent également ; mais les teneurs sont très variables en fonction du sol dans lequel ils sont ont été cultivés.



- **Moyens de défense exogène**

- ✓ **Vitamine E**

La vitamine E ou α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines, le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidique RO₂ qui Propagent les chaînes de peroxydation [82].

Les huiles végétales sont les plus riches en vitamine E. les noisettes et les légumes Verts à feuilles (salades, épinards...) sont également de bonnes sources de vitamine E. Cet antioxydant résiste à la chaleur [83].

- ✓ **Vitamine C**

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble ; l'acrobate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles OH, mais aussi avec les radicaux superoxydes O₂ [82]. Ses principales fonctions sont la contribution au fonctionnement du système immunitaire, l'implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges, la protection des composés situés dans les compartiments cellulaires t tissulaires hydrosolubles et la participation dans les mécanismes liés à la métabolisation du fer [84].

Cette vitamine est particulièrement sensible à la chaleur, à la lumière, et elle est soluble dans l'eau. Elle est présente dans tous les fruits et les légumes frais, et particulièrement dans l'acérola, les agrumes, le poivron rouge...etc. [85].

d. Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le stress oxydatif sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : Cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète.

Par exemple, l'oxydation des lipides est un facteur favorisant l'apparition de maladies cardiovasculaires, alors que celle de l'ADN se retrouve à différents stades qui conduisent au développement de cancers [86].



I.2.1.5. Les antioxydants

Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydant en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant [87].

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion [81]. On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule.

a. Les antioxydants enzymatiques

Les cellules possèdent des enzymes antioxydants qui sont des systèmes de défense très important car les enzymes ont la capacité de fonctionner en permanence. Ce ligne de défense est constitué d'enzymes ou protéines antioxydants de superoxyde dismutase (SOD) de catalase, et de glutathion peroxydase, [88] (le zinc, le sélénium et le manganèse) qui interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libre [89]. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge.

b. Les antioxydants non enzymatiques

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer : le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque.

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), ou les caroténoïdes, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables. D'autres composés tels que les huiles essentielles, les alcaloïdes, les polyphénols, les phytates et les flavonoïdes, apportés par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres [90 ; 91].

c. Les antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercitrine.



Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles OH et peroxydes RO₂. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidiques, mais d'une manière moins efficace que celle de l'α-tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet O₂, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire [82].

d. Les antioxydants synthétiques

Il s'agit du butylhydroxytoluène (BHT) et des esters de l'acide gallique : gallate de propylée, gallate doctyle, et de dodécyle. Le BHT est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Le BHA est un mélange de deux isomères de position dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT.

Il existe d'autres antioxydants synthétiques peu utilisés tels que la TBHQ (tertiobutylhydroquinone) utilisée pour la conservation des huiles brutes, l'acide nordihydrogualarétique (NDGA). Ce dernier est utilisé dans les produits à usage topique et le 4-hydroxyméthyl 2,6-ditertiobutylphénol ou Inox 100, dont les propriétés antioxydantes sont voisines de celles du BHT.

***Chapitre II : La micro-encapsulation
Et la cinétique de la libération du principe actif***





Chapitre II

La micro-encapsulation et la cinétique de la libération du principe actif

Partie 1 : La micro-encapsulation et la cinétique

II.1.1. Notion essentielle sur les médicaments

II.1.1.1. Définition du médicament

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé « OMS »

« Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines. Toute substance ou composition pouvant être administrée à l'homme en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques chez l'homme est également considérée comme médicament ». Le médicament est constitué de deux éléments principaux :

a. Principe actif (PA)

C'est l'élément possédant les propriétés curatives et/ou préventives du médicament.

b. Excipient ou adjuvant

Les excipients est un mélange de substances dites auxiliaires, inactives par elles-mêmes sur la maladie, qui facilitent la préparation et l'emploi du médicament. Celui-ci comporte en plus le conditionnement qui en facilite la délivrance, l'utilisation et en assure la conservation.

c. Additif

Toute substance qui n'est pas considérée comme une caractéristique d'un médicament, dont son addition à un but technologique ou organoleptique à une quelconque étape de fabrication.

Exemple : les conservateurs, les colorants, les aromatisants...etc.



II.1.2.2. Classification des capsules

Le type de particules obtenues par micro-encapsulation dépend des propriétés physico-chimiques de la matière active et de la matière enrobant, de leur composition et de la technique utilisée, on retrouve deux types de microparticules (**Figure II.1.2**) qui diffèrent par leur morphologie [93].

- a. **Les microcapsules** : sont des particules réservoirs constituées d'un cœur dans lequel se trouve la matière active, qui peut être sous forme liquide ou solide entourée par une enveloppe formée par l'agent encapsulant [93].
- b. **Les microsphères** : sont des particules présentées sous une structure matricielle. Elles sont constituées d'un réseau polymère dans lequel se trouve finement dispersée la matière active à l'état de fines particules solides ou de gouttelettes de solutions [93].

II.1.3. La micro-encapsulation

II.1.3.1. Définition

Micro-encapsulation est une technique utilisée pour préserver la qualité des substances sensibles et pour produire des matériaux présentant de nouvelles propriétés intéressantes. Elle implique l'enrobage d'une matière active dans un matériau enveloppant à l'échelle micrométrique. Ce processus permet d'isoler et de protéger les particules de l'environnement extérieur. Le produit résultant de ce processus est appelé des microparticules, qui se distinguent par leur morphologie et leur structure [94].

II.1.3.2. Intérêt de la micro-encapsulation

Les raisons de la micro-encapsulation sont innombrables, il y a plusieurs pour lesquelles les substances peuvent être microencapsulé. Dans certains cas, le noyau doit être isolé de son environnement, la micro-encapsulation assure diverses applications ou fonctions tels que [95 ;96] :

- ✓ Contrôle du relargage de la substance médicamenteuse, véhiculer le principe actif jusqu'à sa cible.
- ✓ Réduction de la toxicité et l'irritation gastro-intestinale.



- ✓ Stabilisation et protection des substances sensibles à l'environnement extérieur (l'oxygène, l'humidité ou la lumière), par exemple Bakan et Anderson ont rapporté que l'encapsulation de palmitate de vitamine A avait une meilleure stabilité.
- ✓ Diminution de la volatilité de plusieurs médicaments.
- ✓ Modification dans le site d'absorption pour les médicaments qui ont la toxicité à pH inférieur.
- ✓ Masquage des propriétés organoleptiques comme la couleur, le goût, l'odeur de la substance, et ainsi l'amélioration de la conformité du patient.
- ✓ Empêchement de l'incompatibilité entre les drogues (séparation des composants incompatibles pour des raisons fonctionnelles).
- ✓ Conversion des composants actifs liquides en un pseudo-solide sec pour faciliter la manipulation et le stockage, par exemple Eprazinone.

II.1.3.3. Type des microparticules

Les systèmes d'encapsulation présentent une grande variété de structures et peuvent donc être classés en deux grandes catégories.

a. Les systèmes matriciels (microsphères)

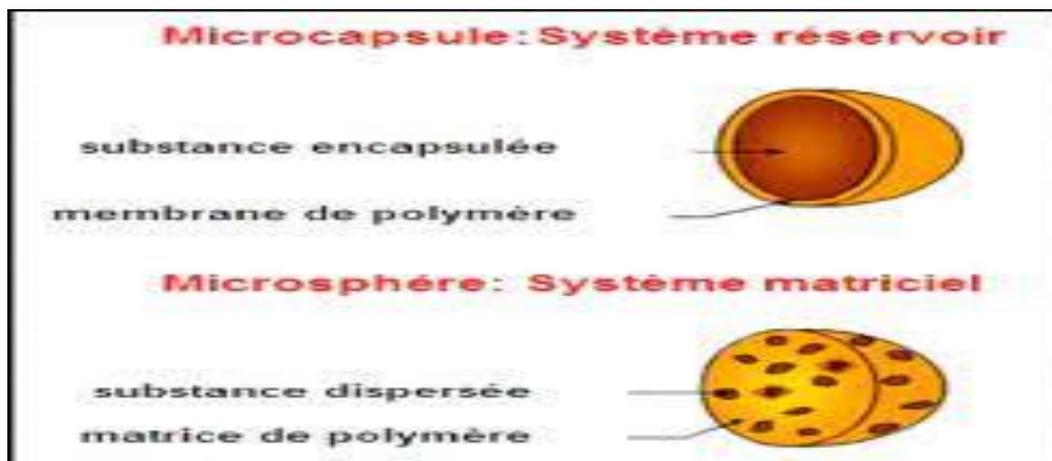
Les microcapsules sont des structures réservoirs et sphériques, elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres, le taux d'encapsulation peuvent être particulièrement élevées : entre 85% et 90% de masse de matière active par rapport à la masse de microparticules [94].

b. Les systèmes réservoirs (microcapsules)

Les microsphères sont des structures matricielles, de forme sphérique, constituées de polymères de référence (bio) dégradable. Dans le cas de microsphères, le principe actif est soit incorporé à l'intérieur d'un réseau polymères durant la formation des microsphères. Dans ce cas, les teneurs en matière active sont moindres : de l'ordre de 20% à 35% mais parfois ce taux atteindre 50% [94].



Figure II.1.2 : Différent système de microparticules [94].



II.1.4. Techniques d'encapsulations

Les procédés d'encapsulation sont généralement catégorisés dans trois classes :

- ✓ Procédés mécaniques.
- ✓ Procédés chimiques.
- ✓ Procédés physico-chimiques.

II.1.4.1. Procédé mécanique

Le procédé mécanique de l'encapsulation repose sur la nébulisation de la formulation, ou l'enrobage de microparticules suspendant en lit fluidisé, ou l'extrusion du mélange de matière active et l'agent enrobant. La formulation des matières sera pulvérisée de sorte que la matière active soit encapsulée [97].

a. Nébulisation/séchage

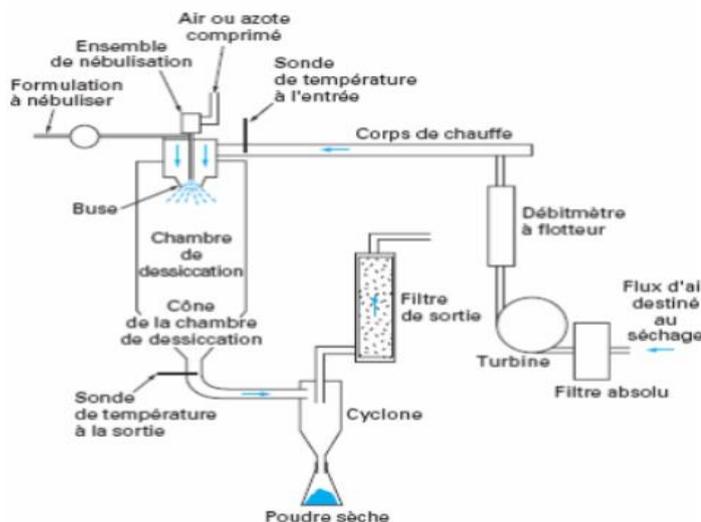
Ce procédé vise à convertir une formulation liquide de départ en une particule microscopique sèche. La formulation liquide comprend une phase contenant des substances actives sous différentes formes (solution, émulsion, dispersion de particules solides) ainsi qu'une autre phase contenant la solution de l'agent d'enrobage. En général, ce procédé comprend quatre étapes clés :

- ✓ Diffusion de la phase liquide (nébulisation) pour former un aérosol.
- ✓ Mise en contact de l'aérosol avec un flux d'air, porté à une température contrôlée.



- ✓ Séchage rapide de l'aérosol pour former des microparticules solides.
- ✓ Séparation et collection de la poudre de microparticules et de l'air contenant le solvant vaporisé.

Figure II.1.3 : Système de micro-encapsulation mécanique Nébulisation/séchage [98].



Ce procédé de nébulisation/séchage a été appliqué par **Li** et **Al** pour encapsuler l'ibuprofène, dans une microcapsule en gélatine.

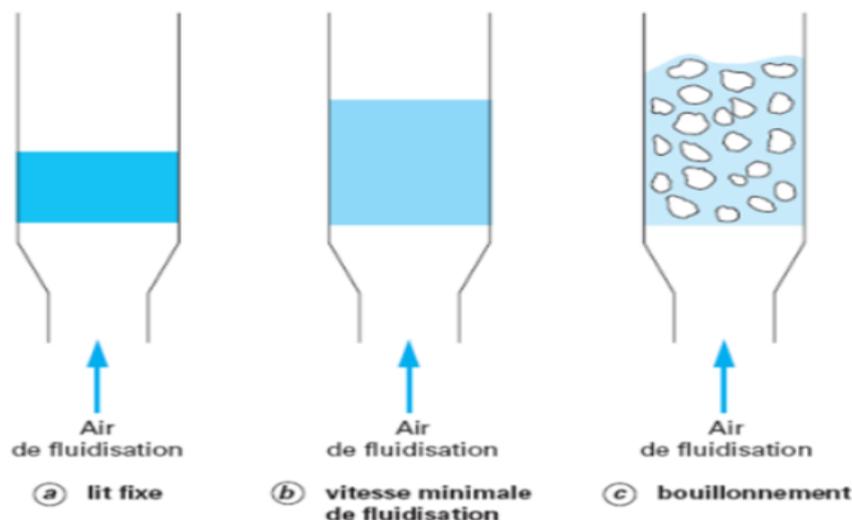
b. Procédé d'enrobage en lit fluidisé

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé est utilisé pour les substances actives composées de particules solides (granulés, cristaux). Cependant, il est possible d'encapsuler des substances actives liquides en les absorbant dans des supports poreux particuliers. Ce procédé permet un enrobage continu des particules, ce qui entraîne la production de microcapsules. Il se déroule en suivant une séquence cyclique en trois étapes.

- ✓ Fluidisation de la poudre de particules.
- ✓ Pulvérisation du matériau enrobant sur les particules.
- ✓ Séchage et filmification de l'enrobage [99].



Figure II.1.4 : Différents états de la substance active à encapsuler en lit fluidisé [98].



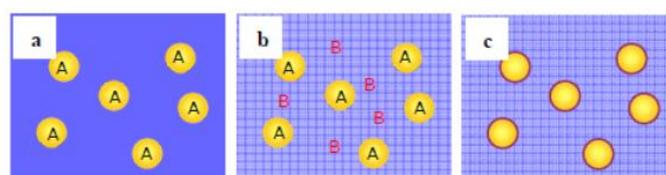
Cette technique a été utilisée pour encapsuler des molécules actives telles que le diclofenac sodique.

II.1.4.1. Procédés chimiques

a. Polycondensation interfaciale

Ce processus implique l'utilisation de deux composés ayant des groupes fonctionnels complémentaires (A et B), chacun étant soluble dans l'une des phases d'un système diphasique. L'encapsulation de principes actifs peut être effectuée à l'aide de cette méthode en suivant un protocole en deux étapes. Dans un premier temps, une émulsion est préparée, où la phase dispersée contient l'espèce à encapsuler ainsi qu'une émulsion. Ensuite, cette émulsion est réduite pour introduire le second produit dans la phase continue. La réaction débute alors à l'interface des gouttelettes. À la fin de la réaction, sur une membrane qui enferme l'espèce à encapsuler. [100].

Figure II.1.5 : Schéma du principe de la microencapsulation par polycondensation interfaciale.





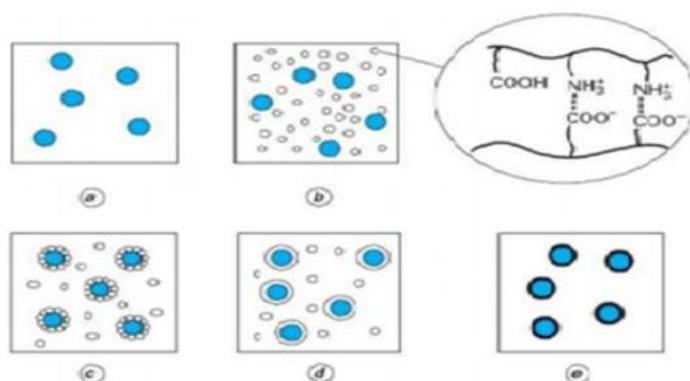
(a) Obtention d'une émulsion avec un monomère A dans les gouttelettes, (b) Dilution de l'émulsion avec un monomère B dans la phase continue, (c) Polycondensation des monomères A et B à l'interface des gouttelettes pour former la membrane des microcapsules [101].

II.1.4.3. Procédés physico-chimiques

a. Coacervation

La coacervation est un processus qui consiste en la séparation des phases au sein d'une solution afin de désolvater un polymère. Le procédé de coacervation consiste à abaisser la solubilité d'un polymère initialement solubilisé dans un solvant approprié, en variant la température ou le pH du milieu ou par ajout d'un électrolyte, d'un non-solvant ou d'un deuxième polymère (agent coacervation). Il se forme alors deux phases liquides : l'une riche en polymère appelée coacervat et l'autre pauvre en polymère, il s'agit d'une coacervation complexe. Le procédé de coacervation complexe peut être séparé en Cinque étapes comme le montre la **Figure II.1.6** [102].

Figure II.1.6 : Réticulation interfaciale des microcapsules par coacervation complexe.



(a) Dispersion du principe actif dans la solution de polymère, (b) formation du coacervat ou séparation de phase, (c) dépôt du coacervat et formation d'un enrobage, (d) renforcement de l'enveloppe, (e) l'enrobage est consolidé par réticulation [101].

b. Emulsion-évaporation de solvant

Une émulsion selon l'IUPAC 'International Union of Pure and Applied Chemistry', est une dispersion colloïdale d'un liquide sous forme de gouttelette (phase dispersée ou



Chapitre II : La micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

discontinue) dans un autre liquide non miscible (phase dispersante ou continue) comme l'eau et l'huile, à laquelle on ajoute généralement un tensioactif afin d'éviter la séparation des phases et d'assurer la stabilité de l'interface de l'émulsion [102].

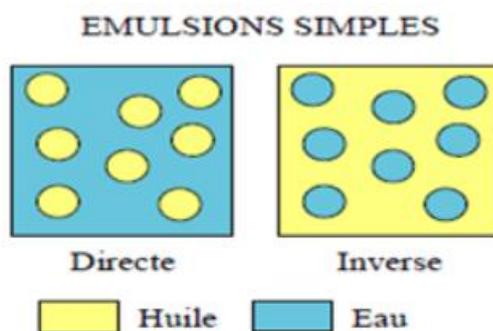
Le processus de dispersion implique de soumettre l'une des phases à des forces de cisaillement au sein de l'autre phase, ce qui conduit à la formation de gouttelettes dont la taille peut varier d'environ 0,1 à 10 μm .

c. Emulsion simple

L'émulsion eau/huile est généralement utilisée pour les PA faiblement hydrosolubles ou insolubles dans l'eau, tandis que l'émulsion huile/eau est envisagée lorsque le PA est hydrosoluble. Le type d'une émulsion simple, directe ou inverse, est fixé au premier ordre par la solubilité préférentielle du tensioactif dans l'une ou l'autre des phases, en accord avec la règle empirique de Bancroft : le recours à un tensioactif hydrosoluble permet de former préférentiellement une émulsion directe, alors qu'un tensioactif liposoluble favorise une émulsion inverse [102,103].

Cette méthode est la plus simple et toutes les autres en dérivent, elle s'effectue en préparant la phase dispersée par dissolution du PA et le polymère dans un solvant organique, puis en réalisant l'émulsification (la mise en suspension) qui consiste à introduire la phase hydrophile dans la phase lipophile [102,103]. Cette étape est suivie par l'évaporation du solvant organique qui engendre la solidification des gouttelettes de phase dispersée [103].

Figure II.1.7 : Représentation de l'émulsion simple [104]



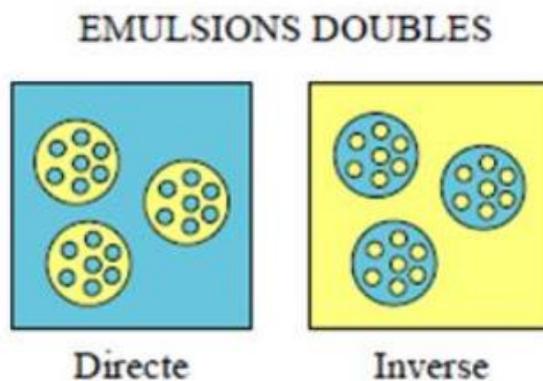


d. Emulsion double

Les émulsions doubles ou multiples, grâce à leur structure compartimentée, ont depuis longtemps été prises comme un matériau idéal pour agir en tant que microréservoirs. [103]. L'encapsulation des composés hydrophiles ne peut s'effectuer par la méthode eau/huile du fait de leur insolubilité dans les solvants organiques ; et de leur diffusion vers la phase continue durant l'étape d'émulsification conduisant à de faible taux d'encapsulation.

La solution aqueuse contenant le PA à encapsuler est émulsionnée avec la phase huileuse (solution organique dissolvant ou dispersant les polymères) avec une agitation ultrason pour obtenir une émulsion submicronique du type eau/huile. Cette émulsion est ensuite utilisée comme phase dispersée dans la troisième solution aqueuse contenant l'agent tensioactif, permettant d'obtenir une double émulsion (E/H/E). Enfin, les particules obtenues sont séchées et récupérées [103,105].

Figure II.1.8 : Représentation de l'émulsion double [104].



II.1.5 : Application de la micro-encapsulation

Dans les années 1950, la micro-encapsulation a été utilisée pour la fabrication de capsules renfermant des colorants, qui étaient utilisées dans la préparation de papiers permettant la duplication sous faible pression. Cette application industrielle a marqué les débuts de la micro-encapsulation. Depuis lors, la recherche dans le domaine de l'encapsulation s'est intensifiée pour développer de nouvelles technologies d'encapsulation, encapsuler de nouveaux composés et proposer de nouveaux matériaux d'enrobage. Par exemple, des polymères biocompatibles ont été développés pour des applications médicales [106].



Chapitre II : La micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

On trouve désormais des applications de la micro-encapsulation dans de nombreux domaines industriels, listés dans le tableau suivant, dans lequel sont également précisés des exemples de composés encapsulés [106 ;107].

Tableau II.1.1: Application de la micro-encapsulation dans l'industrie [106 ;107].

Domaine industriel	Exemples de composés encapsulés
Pharmacie et médical	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, bactéries, vitamines, minéraux, antigènes, anticorps...
Cosmétique	Parfums, huiles essentielles, anti transpirants, agents bronzants, crèmes solaires, colorants, capillaires, baumes démêlants, mousses à raser...
Alimentaire	Huiles essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, minéraux, colorants, enzymes, levures, micro-organismes...
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales...
Biotechnologie	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules vivantes, cellules artificielles, cultures tissulaires, composés nutritionnels...
Chimie	Catalyseurs, enzymes, additifs pour plastiques, eau (plâtre et béton), inhibiteurs de corrosion, retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, parfums, huiles essentielles, agents lubrifiants...
Détergent	Adoucissants, antistatiques, agents décolorants, agents moussants, silicones, cires, détachants...
Textile	Colorants, parfums, pigments, bactéricides, fongicides, répulsifs d'insectes, agents antistatiques, retardateurs d'incendie, agents imperméabilisants, adhésifs, composés bioactifs médicaux, composés bioactifs cosmétiques...
Graphisme et impression	Colorants, pigments, parfums, révélateurs, cristaux liquides, toners, composés photosensibles...



Photographie	Halogénures d'argent, pigments, colorants, composés photo polymérisables, révélateurs pour photographies couleurs, plastifiants...
Electronique	Cristaux liquides, matériaux semi-conducteurs, adhésifs, agents de séchage, retardateurs de flammes, antistatiques...
Traitement des déchets	Microorganismes, substrats, détoxifiants, déchets liquides (solidification), déchets industriels à risques, déchets radioactifs...

II.1.6. Objectif de la micro-encapsulation

L'objectif de l'encapsulation est de confiner des matériaux, tels que des principes actifs, à l'intérieur de particules, soit pour les immobiliser, les protéger, les libérer ou les fonctionnaliser. Le tableau présente quelque exemple de motivation d'utilisation de l'encapsulation [108].

Tableau II.1.2 : Objectif de la micro-encapsulation. [108].

Type d'encapsulation	PA	Motivation spécifique
Immobilisation	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules, enzymes. - Substances volatiles. 	<ul style="list-style-type: none"> - Procédé continu ou accélération du procédé. - Allongement de leur durée de vie.
Protection	<ul style="list-style-type: none"> - Cellule, enzymes - Vitamines, huiles insaturées - Aliments, environnement. 	<ul style="list-style-type: none"> - Protection contre le lessivage, le cisaillement. - Protection contre l'oxygène, la lumière, la chaleur. - Elimination du gout, des acides, des enzymes.
Relargage	<ul style="list-style-type: none"> - Matière active ou un de ses sous-produit formés en présence d'un des matériaux encapsulant. 	<ul style="list-style-type: none"> - Libération au moyen de la température, d'une force. - Libération au cours du temps. - Libération dans certains



		environnements (acide, basique, hydratés...).
Fonctionnalisation	<ul style="list-style-type: none"> - Liquides/ gaz - Solides/liquides/gaz - Enzyme et un des matériaux encapsulant 	<ul style="list-style-type: none"> - Les formuler sous formes solide. - Les disperser dans des formulation liquides ou sèches. - Formulation d'un biocapteur.

II.1.7. Principe de la pharmacocinétique

II.1.7.1. Définition de la pharmacocinétique

Pharmacocinétique est une discipline qui utilise des données expérimentales et des paramètres tels que la clairance et le volume de distribution pour étudier comment un médicament se comporte dans l'organisme [109].

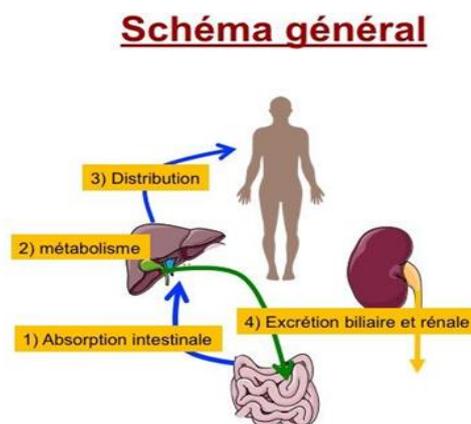
Elle permet d'orienter :

- ✓ Le choix des voies d'administration ;
- ✓ L'adaptation des posologies ;
- ✓ Le choix de l'intervalle thérapeutique [110].

II .1.7.2. Etape de modélisation de la pharmacocinétique

La pharmacocinétique étudie la distribution dans le temps d'un médicament et de ses métabolites dans les différents compartiments du corps (sang, liquide interstitiel, cellule) ainsi que son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination [110].

Figure. II 1.9 : Etapes de modélisation pharmacocinétique LADME [109].





Chapitre II : La micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

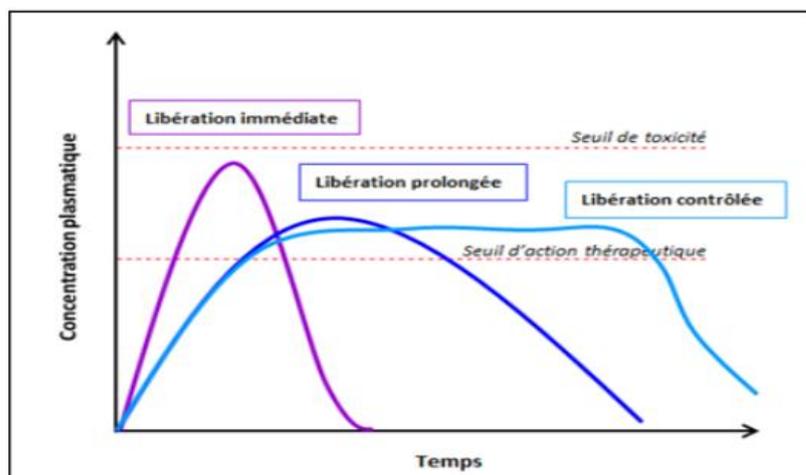
Les galénistes modernes considèrent le médicament, composé d'un ou plusieurs principes actifs et d'excipients, comme un système de délivrance du principe actif. Ce système suit les étapes classiques du système LADME [110].

En thérapeutique, on recherche généralement une libération rapide du principe actif pour obtenir une activité thérapeutique rapide et soulager rapidement le patient. Pour cela, on choisira une forme à libération conventionnelle ou accélérée. Cependant, dans certains cas, on peut souhaiter une libération ralentie ou différée du principe actif afin de prolonger la durée de l'effet thérapeutique. C'est dans cette perspective que les formes à libération modifiée ont été développées. [110].

II.1.8. Les modèles cinétiques de libération des substances actives

La libération contrôlée vise à maintenir une concentration thérapeutique adéquate sur une période prolongée, dépassant ainsi la durée obtenue par une administration répétée tout au long de la journée. Elle consiste donc à modifier la pharmacocinétique du médicament en jouant sur l'absorption de la molécule grâce au système contrôlé. Cette définition se différencie de la libération modifiée qui comprend les formes à libération retardée, accélérée et prolongée où la vitesse de libération est modifiée par rapport à la libération immédiate ou conventionnelle (**figure II.1.11**) [111].

Figure II.1.10 : Représentation des profils de libération d'une substance active : immédiate, prolongée et contrôlée [112].





II.1.8.1. Forme à libération prolongée

Ces formes sont également appelées formes à libération prolongée. Elles délivrent une dose initiale suivie d'une libération continue et progressive dans le temps. En conséquence, la concentration plasmatique efficace est maintenue pendant une durée ainsi plus longue par rapport aux formes conventionnelles.

Dans la plupart des cas on observe une plus ou moins lente diminution de la concentration plasmatique après obtention du maximum [112].

II.1.8.2. Forme à libération répétée

En prenant une seule dose, on observe une courbe similaire à celle obtenue avec des doses répétées d'un médicament conventionnel. Ces formes à libération libérées libèrent une dose initiale, suivies après un certain laps de temps par une ou plusieurs doses équivalentes de principes actifs. Le problème principal est l'obtention d'un intervalle de temps convenable entre les différentes libérations [112].

II.1.8.3. Forme à libération retardée

Ces formulations pharmaceutiques sont conçues pour libérer le principe actif à un moment spécifique, différent de celui d'une forme conventionnelle. Les formes gastro-résistantes, en particulier, sont conçues pour éviter la libération du principe actif dans l'estomac, grâce à l'utilisation d'agents d'enrobage appropriés.

Autrefois, la libération contrôlée était principalement basée sur des principes physico-chimiques, mais aujourd'hui, elle repose également sur des phénomènes biologiques. Son développement a suivi l'évolution de la chimie analytique, de la pharmacocinétique, de la pharmacotechnie et de la biologie. La libération contrôlée est un domaine spécialisé qui englobe le contrôle temporel et spatial de la disponibilité du principe actif, ainsi que les différentes voies d'administration potentielles.

Avec les médicaments conventionnels, on peut être confronté à différents problèmes tels que Les interactions avec d'autres molécules ou aliments, la diminution de la biodisponibilité, le risque de «dose-dumping», une inefficacité due à une mauvaise absorption.

Les objectifs des médicaments à libération contrôlée sont d'ordre thérapeutique et économique :

- Diminuer les effets indésirables.



Chapitre II : La micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

- Augmenter l'efficacité du traitement.
- Améliorer l'observance des patients.
- Redonner vie aux médicaments anciens.
- Réduire les Coûts.

Ils sont réalisables en prévoyant l'absorption du produit actif, en contrôlant sa concentration dans le sang et les tissus et en prolongeant son action pharmacologique de plusieurs heures à plusieurs mois une seule administration. [113].

II.1.9. Mécanisme de relargage du principe actif dans les systèmes à libération prolongé

Lorsque l'administration d'une forme pharmaceutique solide (comme une dragée, une gélule, un comprimé ou des cristaux) est effectuée de manière extravasculaire, la première étape consiste à libérer le principe actif. Cette libération se produit par la désintégration de la forme solide suivie, de la fragmentation en particules de petite taille. Cela conduit à une dispersion fine du principe actif à l'état solide dans le milieu aqueux du site d'administration.

Les facteurs influant la cinétique de libération du ou des principes actifs à partir de la forme galénique solides sont complexes et dépendent de la nature physico-chimique des principes actifs (en particulier leur forme cristalline) d'une part, et d'autre part et surtout, des excipients [114].

La libération du principe actif s'effectue sous l'influence du milieu biologique et des conditions mécaniques du site d'administration (péristaltisme intestinal). On peut alors contrôler, par le choix d'un mode de fabrication approprié, la durée de la libération du principe actif, le lieu et la vitesse d'absorption. La modification de la formulation galénique d'un médicament peut ralentir l'absorption avec une mise en solution lente, et ainsi permettre de prolonger l'effet du médicament dans le temps (formes retard des neuroleptiques ou corticoïdes ...) et/ou de réduire le nombre de prises quotidiennes et/ou d'éviter les effets de pic de concentration.

Un système de libération prolongée comporte un principe actif et le matériel dans lequel le principe actif est chargé. Pour cela, le choix du principe actif et du polymère avec les propriétés désirées est un facteur principal en concevant un système à libération prolongée [115]. Avant de concevoir un système de libération prolongée, on doit choisir le chemin de libération des principes actifs avec plusieurs considérations incluant les propriétés physiques et



Chapitre II : La micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

chimiques de la drogue, les doses de PA, la voie d'administration, type de système de la libération, effet thérapeutique désiré, dégagement physiologique de la drogue du système de la livraison, biodisponibilité de drogue au site d'absorption, et la pharmacodynamie des drogues

II.1.9.1. Modèles théoriques des mécanismes de la libération de principe actif

La libération du principe actif à travers une matrice polymérique est généralement régulée par trois mécanismes qui sont liés à la nature du principe actif, ainsi qu'aux propriétés structurales du polymère, telles que son taux de gonflement, sa vitesse de gélification et son comportement dans les fluides physiologiques.

a. Diffusion fickienne

Dans ce cas, le principe actif se diffuse à travers les chaînes macromoléculaires du polymère en raison de l'existence d'un gradient de concentration entre la matrice et le milieu environnant.

- **Modèle d'ordre 1 ou de Wagner**

Le modèle d'ordre 1 (le rapport de concentration varie exponentiellement en fonction de temps) est celui qui représente le mieux les profils de la cinétique de libération de PA en fonction de temps, exprimés respectivement par les deux équations suivantes :

$$\frac{C}{C_{\infty}} = \frac{M}{M_{\infty}}$$

$$\frac{C}{C_{\infty}} = \frac{M}{M_{\infty}} = 1 - e^{-kt}$$

Avec :

C_t et **C_∞** : sont respectivement les concentrations du PA libéré au temps **t** et à saturation (équilibre).

M_t et **M_∞** : leurs masse ou quantités en mg correspondantes.

K : est la constante cinétique.

- **Modèle de Higuchi**



Pour celui-ci, le rapport des concentrations varie linéairement en fonction de $t_{1/2}$. L'équation du modèle cinétique peut s'écrire globalement ainsi :

$$\frac{C}{C_{\infty}} = \frac{M}{M_{\infty}} = k^{1/2}$$

- **Modèle de Weibull ou de la fonction RRSBW**

Lorsque le profil s'écarte sensiblement du cas idéal d'ordre 1 aux temps faibles, dû à un ralentissement au départ du relargage du PA, ainsi l'équation varie exponentiellement en fonction de temps, mais elle comporte aussi un coefficient de forme ou de sigmoïté β . Elle peut s'écrire de la manière suivante :

$$\frac{C}{C_{\infty}} = \frac{M}{M_{\infty}} = 1 - e^{-\left(\frac{t-t_0}{t \mathcal{L}}\right)^{\beta}}$$

Avec :

t_0 : temps initial.

t_b : temps de correspondant à un pourcentage de 63,2% de PA dissout.

β : est le facteur de sigmoïté. Il est compris dans l'intervalle 0,42-0,59. Pour nos calculs, on peut rendre soit la valeur minimale (0,42), ou maximale (0,59), ou bien la moyenne c-à-dire 0,5. La valeur retenue est celle qui vérifie le plus le modèle (linéarisation de l'équation). [116].

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C_{\infty}}\right) = \left(\frac{t - t_0}{t \mathcal{L}}\right)^{\beta}$$

b. Diffusion non fickienne

Dans cette situation, le principe actif traverse les microparticules qui sont remplies d'eau. Ces microparticules se forment lorsque le polymère se gonfle. Le principe actif s'hydrate avant même de se diffuser vers le milieu environnant. Ce mécanisme est également connu sous le nom de diffusion par transport, qui fait généralement référence à l'état de relaxation-gonflement du polymère.



• **Relargage du principe actif par érosion de polymère : modèle polynomial**

Il est possible également que le relargage de principe actif soit modulé par les trois mécanismes. Un constat souvent observé par Shahet et coll.

Un modèle théorique purement empirique a été proposé par Kosmeyer et Peppas. [117] Celui-ci donnant les différents mécanismes du relargage du principe actif en fonction du temps. Cette expression, est une équation exponentielle décrivant la cinétique de relargage pour une fraction libérée de principe actif < 60%. Ce modèle est reposé dans le but de déterminer la loi qui régit la cinétique de relargage et plus particulièrement quand ce dernier est modulé par plusieurs mécanismes, dont ceux qui ont été cités auparavant par Costa et coll.

$$f(t) = \frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \dots \dots \dots (1) \text{ Relation de Kosmeyer et Peppas}$$

- ✓ **f(t)** : la fraction de principe actif libérée en fonction de temps.
- ✓ **k** : constante décrivant la nature du principe actif, et les propriétés géométriques et structurales des microcapsules du polymère.
- ✓ **n** : exposant décrivant le mécanisme de libération qui peut être soit fickien ou non fickien.
- ✓ **t** : temps de libération de principe actif.

La relation (1) peut être modifiée pour être exprimée en fonction du rayon de la particule (r) (relation (2))

$$f(t) = f_0 + a \left(\frac{t}{r^2}\right)^n$$

- ✓ **f₀** : fraction libérée du principe actif en surface qui capable d'amorcer le relargage .
- ✓ **a** : coefficient égale à kr^{2n} *
- ✓ **r** : rayon de la particule
- ✓ **k** : constante de dissolution
- ✓ **n** : facteur exponentiel de diffusion

Peppas et Sahlin [118] modifient l'expression en ajoutant le terme qui décrit la diffusion du principe actif par transport (équation (3)). Cette expression est mise en avant lorsque le polymère présente un taux de gonflement assez considérable (relaxation).



$$f(t) = f_0 a \left(\frac{t}{r^2}\right) + b \left(\frac{t}{r^2}\right)^{2n} \dots\dots\dots(3)$$

Le rapport représente le pourcentage de contribution des deux mécanismes ensembles. il est également possible d'exprimer l'équation (3) en fonction de la surface de la particule. Fonner et coll. [93] présentent l'expression du diamètre moyen des microparticules en fonction de la surface, qui est donnée comme suit :

$$D = \sqrt{s/\pi} \dots\dots\dots (4)$$

$$f t = f_0 + a \left(\frac{t\pi}{s}\right) + b \left(\frac{t\pi}{s}\right)^{2n} \dots\dots\dots(5)$$

De manière générale, les différents mécanismes de diffusion cités auparavant sont étroitement liés aux différentes architectures des systèmes à libération prolongée. Pour chaque système il lui correspond son mécanisme de libération.

- **L'ordre zéro**

Si la valeur de n est égale ou tend vers la valeur 1, cela veut dire que la matrice est inerte et ne subit pas de dégradation. Ainsi les molécules sont transportées par le milieu et traversent une matrice non poreuse à travers des chaînes de polymères.

Il est appliqué aux formes à libération modifiée de type matriciel inerte avec des PAs peu solubles qui ne se désagrègent pas (la surface de la forme solide ne change pas). Ces formes libèrent le produit sur une grande période de temps à quantités égales. L'équation du modèle est la suivante : (le rapport de concentrations est proportionnel au temps et linéaire en fonction de t).

$$\frac{C}{C_\infty} = \frac{M}{M_\infty} = k_0 t \quad \text{ou bien} \quad Q_t (\%) = k_0 t$$

C_t et C_∞ : sont respectivement les concentrations du PA libéré au temps t et à saturation (équilibre).

M_t et M_∞ : leurs masses ou quantités en mg correspondantes.

Q_t : est le taux de PA dissous à t.

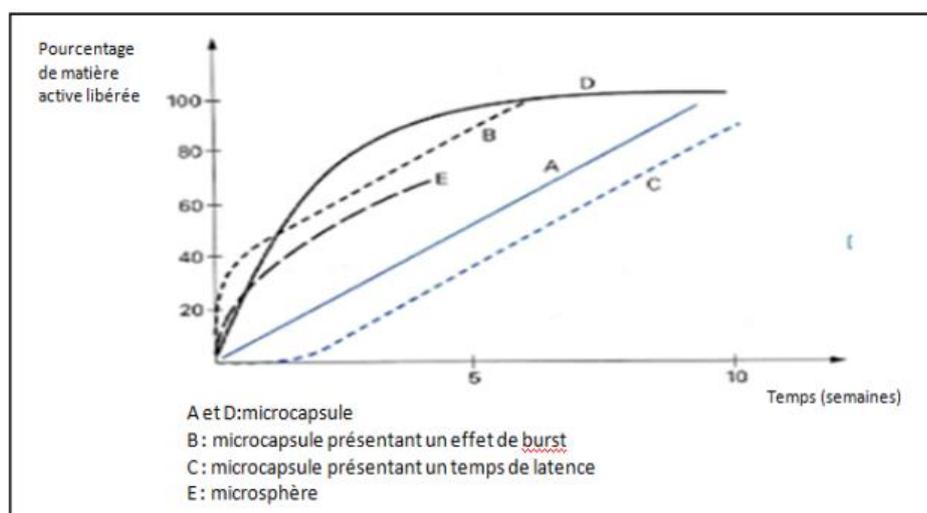
K₀ et k_{0'} : les constantes cinétiques.



II.1.10 : Profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules

La diffusion du principe actif suit différents modes cinétiques de libération, comme illustré dans le (figure II.1.12). À partir des microcapsules, on peut obtenir des profils de libération d'ordre 0 ou d'ordre 1 (profils A et D), en fonction de la solubilité du principe actif dans l'eau. Les profils de libération d'ordre 0 peuvent être modifiés dans leur phase initiale : soit la vitesse de libération est excessivement élevée (effet de BURST) en raison d'un excès de principe actif dans la membrane (profil B), soit il y a un Délai avant la libération, temps nécessaire par exemple pour que le principe actif diffuse à travers la membrane avant d'atteindre le milieu extérieur (profil C). À partir de microsphères, la cinétique de libération suit la loi d'Higuchi (profil E) [93].

Figure II.1.11 : Profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules [93].



Les microparticules à libération prolongée sont très largement utilisées dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique [93].

II.1.11. Différentes voies d'administration des médicaments

La voie d'administration a un impact significatif sur le résultat thérapeutique d'un PA. Les voies orales et parentérales ont reçu le plus d'attention comme routes d'administration de systèmes à libération contrôlée. Un intérêt croissant se développe, cependant, pour d'autres voies d'administration telles que les voies transdermique, oculaire, buccale, et intravaginale [119].



II.1.11.1. Voie orale

L'administration de principes actifs par voie orale est la méthode la plus couramment utilisée, et ses avantages et limitations ont permis le développement d'autres voies d'administration. Lors de la formulation de formes à libération contrôlée destinées à l'absorption systémique par voie orale, il est essentiel de prendre en compte les caractéristiques inhérentes de la physiologie du tractus gastro-intestinal (TGI). Par conséquent, une compréhension approfondie de plusieurs disciplines, telles que la physiologie du TGI, la pharmacocinétique, la pharmacodynamie et la conception de formulations, est essentielle pour le développement systématique et réussi d'une forme pharmaceutique orale.

La pharmacocinétique de l'administration orale se caractérise par un début d'action relativement lent après l'administration, ainsi que par une grande variabilité des conditions environnementales rencontrées par le médicament tout au long de son parcours dans le tractus gastro-intestinal (TGI). Après ingestion par la bouche, la forme médicamenteuse passe par l'œsophage et atteint l'estomac. Le médicament reste dans l'estomac jusqu'à ce qu'il puisse passer par le pylore et être transféré dans l'intestin grêle. Le TGI se distingue par ses structures anatomiques (comme la nature et la structure des épithéliums et des muqueuses), la composition de ses sécrétions (enzymes, pH, sels biliaires, force ionique, tension superficielle, etc.) et le temps de séjour de la forme galénique [120].

Figure II.1.12 : pH et temps de séjour moyens dans les principales régions du tractus gastro-intestinal.

	<u>pH</u>	<u>Temps de séjour</u>
Bouche	6.7 à 7	2 à 10 sec
Oesophage		selon la
Estomac	1.2 à 3 pdtrepas	Petits vol. liqu. à jeun: 10 min à 1 h Repas: 1 à 8 h Premiers passages en qq min
Duodénum	4 à 6	5 à 15
Jéjunum	6 à 7	2 à 3.5 h
Iléon	7 à 8	3 à 6 h
Colon	7 à 8	Caecum et colon ascendant: Colon transverse: 3 à 4 Colon descendant: 3



Chapitre II : La micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

Pour la plupart des médicaments, la voie orale demeure la voie d'administration privilégiée. Les formes prises par voie orale présentent en effet une grande facilité d'administration pour le patient, tandis que pour les chercheurs, la physiologie du système gastro-intestinal (GI) est facilement modélisable. Une absorption complète, uniforme et reproductible du médicament administré est recherchée afin d'optimiser l'efficacité thérapeutique, en obtenant les concentrations plasmatiques désirées endéans, et pendant un laps de temps déterminé [121].

Le passage d'un principe actif (PA) de la forme pharmaceutique à la circulation systémique peut être décrit comme un processus incluant quatre étapes :

- ✓ Délivrance du médicament.
- ✓ Libération et dissolution du PA.
- ✓ Passage de la substance active dissoute à travers les membranes d'absorption.
- ✓ Transition entre la membrane biologique lipophile et la circulation sanguine.

L'étape caractérisée par la cinétique la plus lente sera celle qui limitera et contrôlera l'ensemble du processus de libération et de résorption de la substance active à partir de la forme orale [122].

Partie 2 : Méthodologie des plans d'expériences

Le terme "plans d'expériences" vient de l'anglais "Design of Experiments" qui se traduit par "conception des expériences". Les plans d'expériences constituent « un essai technologique d'utilisation maximale des données ».

II.2.1. Définition

Un plan d'expérience constitue une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats [123].

II.2.2. Facteur

Les variables que l'on désire étudier sont appelées facteurs. En général, un facteur varie entre deux bornes : la borne inférieure et la borne supérieure. Dans le langage des plans,



on dit que le facteur varie entre le niveau bas (borne inférieure que l'on note souvent par -1) et le niveau haut (borne supérieure que souvent notée par +1) [124].

II.2.3. Réponse

La réponse est la grandeur mesurée à chaque essai ; le plan vise à déterminer les facteurs influençant ou l'évolution de l'influence en fonction de ceux-ci. Cette grandeur est souvent mesurable comme la résistance à la compression, l'affaissement et l'air occlus mais elle peut également être qualitative, par exemple une appréciation visuelle sur l'état d'une surface [125].

II.2.4. Construction du plan d'expériences

La construction d'un plan d'expériences pour l'étude des effets des facteurs peut s'appuyer sur deux grandes familles de critères :

- ✓ Les critères d'orthogonalité, la construction des plans se fait à partir de règles combinatoires.
- ✓ Les critères d'optimalité, la construction des plans se fait à partir de règles algorithmiques [126].

II.2.5. Terminologie

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée y , porte le nom de réponse. Les variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées facteurs. On parle donc des facteurs qui influent sur une réponse. Les termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences [124].

II.2.5.1. Domaine d'étude

Dans la pratique, l'expérimentateur sélectionne une partie de l'espace expérimental pour réaliser son étude. Cette zone particulière de l'espace expérimental est le domaine d'étude. Ce domaine est défini par les niveaux hauts et les niveaux bas de tous les facteurs et éventuellement par des contraintes entre les facteurs [127].

II.2.5.2. Méthodologie expérimentale

La démarche à respecter est la suivante :

- ✓ Définition de l'objectif.
- ✓ Choix des réponses expérimentales.



- ✓ Choix des facteurs et du domaine expérimental d'intérêt.
- ✓ Etablir la stratégie expérimentale.
- ✓ Construction de la matrice d'expériences.
- ✓ Construction du plan d'expérimentation.
- ✓ Expérimentation.
- ✓ Calcul des estimations des informations recherchées.
- ✓ Interprétation des résultats [128].

II.2.6. L'intérêt des plans d'expériences

L'intérêt majeur des plans d'expérience réside dans le fait qu'ils permettent d'optimiser le nombre d'expérimentations à réaliser lors de la phase d'essais, en déterminant au préalable les réels facteurs ou combinaisons de facteurs influents sur la réponse du système à étudier [123].

II.2.7. Notation des plans d'expériences

Pour k facteurs prenant deux niveaux le plan complet est noté 2^k

Le plan fractionnaire, moitié du plan complet, a ou $\frac{1}{2} 2^k$ ou 2^{k-1} essais.

On peut donner une signification à chaque caractère de cette notation :

- ✓ Le k signifie qu'il y a k facteurs étudiés
- ✓ Le 2 signifie que chaque facteur prend deux niveaux
- ✓ Le 1 signifie que le nombre d'essais du plan a été divisé par 2.

Un plan 2^{k-q} permet d'étudier k facteurs prenant chacun deux niveaux. Le plan complet a été divisé par 2^q [129].

II.2.8. Types des plans d'expériences

II.2.8.1. Plans factorielles complets

a. Définition

Les plans factoriels complets à deux niveaux sont les plus utilisés en raison de leurs simplicités et la rapidité à les mettre en œuvre. Pour ces plans, le nombre des niveaux de chaque facteur est limité à deux. Toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation. Ces plans peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continues et pour les variables discrètes [130].



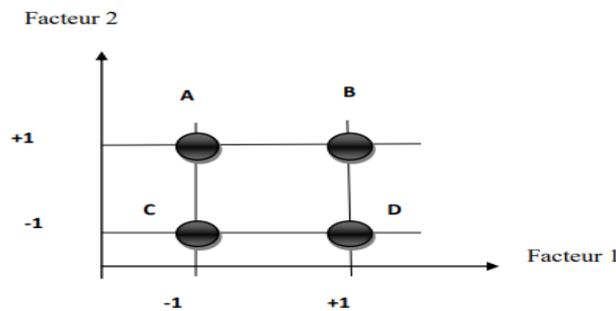
Ils sont notés 2^k . Où :

2 : correspond aux niveaux maximal et minimal qui délimitant le domaine d'étude d'un facteur.

K : définit le nombre de facteurs étudiés [131].

Soit par exemple un plan factoriel complet à 2 facteurs noté 2^2 , pour avoir une meilleure précision du résultat des 4 essais il faudrait choisir une meilleure stratégie en choisissant les points de mesure aux extrémités du domaine expérimental. On note ces points par A, B, C, D (figure II.2.1).

Figure II.2.1 : Représentation du domaine expérimental pour un plan 2^2 [132].



Plan 2^2 : facteurs A et B 4 expériences.

Plan 2^3 : facteurs A, B et C 8 expériences.

Les matrices d'expériences se construisent selon les tableaux suivants pour les cas des plans 2^2 et 2^3 avec des facteurs A, B et C.

Tableau II.2.1: Exemples de plans d'expériences.

N° essais	A	B
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1

N° essais	A	B	C
1	-1	-1	-1



Chapitre II : La micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

Plus généralement, la matrice d'expériences comporte k colonnes pour les facteurs principaux et 2^k lignes soit 2^k essais. Elle se construit selon la règle suivante : colonne du 1er facteur : alternance de -1 et +.

- ✓ Colonne du 2^{ème} facteur : alternance de -1 et +1 de 2 en 2
- ✓ Colonne du 3^{ème} facteur : alternance de -1 et +1 de 4 en 4
- ✓ Colonne du 4^{ème} facteur : alternance de -1 et +1 de 8 en 8

Et ainsi de suite pour un nombre plus élevé de facteurs.

b. Avantages des plans factoriels complets

- ✓ Ce sont des plans faciles à construire et à contrôler.
- ✓ Ils minimisent des risques lorsque le facteur ne prend que deux niveaux.
- ✓ Ce sont des plans basés sur les matrices d'Hadamard ce qui permet à l'expérimentateur d'avoir une procédure optimale.
- ✓ Ils permettent une modélisation mathématique immédiate.
- ✓ Les résultats obtenus avec un premier plan peuvent être utilisés en partie ou en totalité, soit pour exploiter une nouvelle zone du domaine expérimental, ou bien pour établir un modèle mathématique de degré plus élevé.

Ces plans présentent également un inconvénient ; c'est qu'il oblige rapidement de faire plusieurs essais. Si par exemple on veut faire une étude à 8 facteurs, il faut réaliser 256 expériences alors que lors des interprétations des résultats, il y'a beaucoup d'essais qui sont inutiles comme les interactions qui sont nulles et les facteurs sans influences [133].

a. Détermination de l'équation du modèle

La réponse y est liée aux variables opératoires par un modèle réel, qui peut être approché par un modèle linéaire. Dans le cas des plans factoriels complets, le modèle mathématique associé est un modèle de premier degré par rapport à chaque facteur. Il est de type [130].

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_{12} + \epsilon$$



Avec :

Y : est la réponse

X_{1,2} : représente le niveau attribué au facteur 1,2

b₀ : est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude

b₁ : est l'effet (ou effet principal) du facteur 1

b₂ : est l'effet (ou effet principal) du facteur 2

b₁₂ : est l'interaction entre les facteurs 1 et 2

ε : est l'écart.

II.2.8.2. Plans centrés composés

Un plan composite centré (plan de Box et Wilson) est un plan utilisé dans la construction d'une surface de réponse. Ils permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. Ils sont utilisés pour les variables continues.

Un plan composite est constitué de trois parties :

- ✓ Un plan factoriel dont les facteurs prennent deux niveaux.
- ✓ Au moins, un point expérimental situé au centre du domaine d'étude.
- ✓ Des points axiaux, ces points expérimentaux sont situés sur les axes de chacun des facteurs. **La figure II.2.2**, représente un plan composite pour deux facteurs.

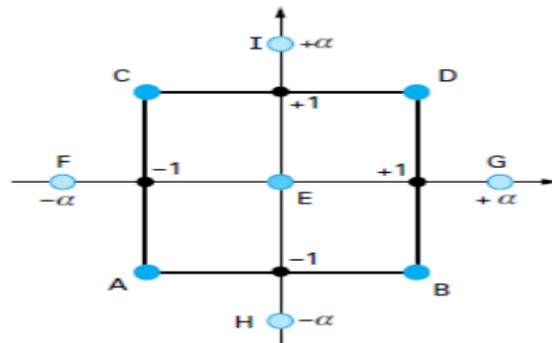
Les points A, B, C et D sont les points expérimentaux d'un plan factoriel 2^2 , le point E est le point central (il peut être répété une ou plusieurs fois), les points F, G, H et I sont les points axiaux, ils forment ce que l'on appelle le plan en étoile [130].

Le nombre total d'essais (N) à réaliser pour un plan composite centré est la somme de :

- ✓ **n_f** : Essais d'un plan factoriel complet.
- ✓ **2k** : Essais en étoile sur les axes à une distance α du centre du domaine (k : nombre de facteurs).
- ✓ **n₀** : Essais au centre du domaine.



Figure II.2.2 : Plan composite pour deux facteurs [130].



On peut étudier autant de facteurs supplémentaires qu'il y a d'interactions dans le plan de base. L'espace expérimental possède autant de dimensions qu'il y a de facteurs et le modèle mathématique correspond à la relation suivante :

$$Y = b_0 + \sum b_i x_j + \sum b_{ij} x_i x_j + \dots + \sum b_{ij} x_i^2 + b_{ij} \dots z x_i x_j \dots x_z + \epsilon$$

Un plan comportant k facteurs à deux niveaux est noté 2^k

Le k en exposant signifie qu'il y a k facteurs étudiés.

Le 2 indique le nombre de niveaux par facteur.

Généralement, la matrice d'expériences comporte k colonnes pour les facteurs principaux et lignes soit essais. Elle se construit selon la règle suivante :

- ✓ Colonne du 1er facteur : alternance de -1 et +1
- ✓ Colonne du 2ème facteur : alternance de -1 et +1 de 2 en 2
- ✓ Colonne du 3ème facteur : alternance de -1 et +1 de 4 en 4
- ✓ Colonne du 4ème facteur : alternance de -1 et +1 de 8 en 8

Et ainsi de suite pour un nombre plus élevé de facteurs [134].

II.2.8.3. Plans Box-Behnken

Les plans de Box-Behnken comptent toujours 3 niveaux par facteur. On commence avec un plan factoriel complet, puis on utilise les interactions du plan complet pour construire de nouveaux facteurs en rendant leurs niveaux de facteurs identiques à ceux des termes d'interaction respectifs [135].

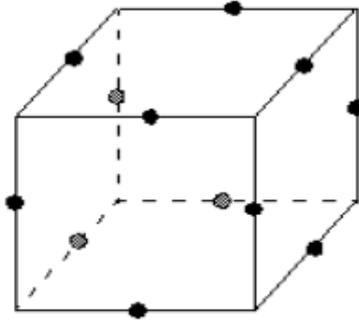
- ✓ S'il y a deux facteurs prenant chacun trois niveaux, il faut exécuter 9 essais.
- ✓ S'il y a trois facteurs prenant chacun trois niveaux, il faut exécuter 27 essais.



Chapitre II : La micro-encapsulations et la cinétique de la libération du principe actif

Les plans de Box-Behnken (**figure II.2.3**) possèdent des combinaisons de traitement qui sont situées aux points centraux des bords de l'espace expérimental et qui requièrent au moins trois facteurs continus [156].

Figure II.2.3 : Plan de Box-Behnken à trois facteurs [136].



Chapitre III : Matériels et Méthodes





Chapitre III

Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de génie des procédés au niveau de « L'université A-Mira, Bejaïa ».

Cette partie expérimentale décrit le matériels et méthodes utilisées dont :

- ✓ L'extraction par les solvants organiques à polarité croissante de la plante étudiée, détermination du rendement, caractérisation par UV visible, par HPLC, suivi par la détermination des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux.
- ✓ Etude de l'activité antioxydante par DPPH.
- ✓ Formulation d'un médicament forme sèche par micro-encapsulation, et étude de la cinétique de libération dans le milieu physiologique.

III.1. Matériel végétale

III.1.1. Cueillette

Les grenades ont été récoltés dès le mois de décembre sur les hauteurs de « Beni Maouche ». Ce sont des grenades de climat tempéré, originaire de la variété *Punica granatum*. Les grenades de cette région (W. Bejaia) sont connues pour leur arôme intense, leur pulpe rouge foncé et leur peau assez épaisse mais facile à peler d'une couleur rouge orangé et de taille généreuse (**Tableau III.1**).

Tableau III.1 : Référence et origine de l'échantillon étudié.

Nom scientifique	Famille	Période de récolte	Lieux de récolte	Partie étudié
<i>Punica granatum</i>	<i>Punicaceae</i>	Décembre	Beni Maouche	Ecorces de grenade

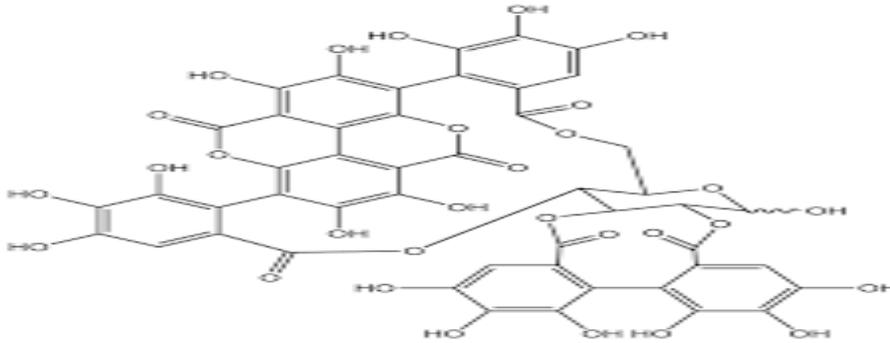
a. Couleur d'écorce de grenade

La couleur jaune de l'écorce de grenade vient de ses composants tels que la punicaline, la punicalagine, les granitines A et B et les puniacortiènes A, B, C et D. L'écorce de grenade



aussi appelée péricarpe, contient aussi deux acides hydroxybenzoiques : l'acide ellagique et gallique. Sur la Figure III.1, nous avons représenté la structure chimique de la punicaline.

Figure III.1 : Structure chimique de la punicaline.



III.1.2. Prétraitements de l'échantillon

a. Lavage et séchage

Les écorces de grenade ont été récoltées avec soin pour préserver leur qualité. Avant de les laver, elles ont été triées pour enlever les parties endommagées. Ensuite elles ont été plongées dans l'eau pour enlever les impuretés et les résidus. Après lavage, elles ont été séchées à l'air libre pour éviter toute altération de leur composition et de leur texture. Une fois complètement sèches, elles ont été entreposées dans un endroit frais et sec pour une conservation optimale. Grâce à ces étapes de traitement minutieuses, les écorces de grenade ont été préparées pour une utilisation ultérieure.

b. Broyage, tamisage et conservation

- **Broyage**

Une fois que l'écorce est prête, elles seront coupées en petites morceaux ensuite introduites dans un mortier en verre ou en porcelaine, et écrasée en une fine poudre à l'aide d'un pilon (**Figure III.2**). Cette poudre est ensuite placée dans un broyeur à couteaux, composé d'une chambre au-dessus d'un tamis de 100 μm et d'un plateau de récupération (**Figure III.3**).



Figure III.2 : Broyage à l'aide d'un mortier en porcelaine.



Figure III.3 : Broyage à l'aide d'un broyeur à couteaux.

- **Tamissage**

La poudre d'écorces de grenade a été tamisée à travers un tamis fin de diamètre de maille de 100 μm pour garantir une texture fine et uniforme de celle-ci. On a répété cette opération plusieurs fois pour obtenir une poudre fine et pure de 20 grammes (**Figure III.4**).



Figure III.4: Tamis de 100 µm et balance analytique de précision.

- **Conservation**

Pour une conservation optimale de la poudre, il est important de la stocker dans un récipient hermétique, à l'abri de l'humidité et de la lumière et dans un endroit frais et sec pour éviter toute dégradation et altération de la matière.

III.2. Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes

Les composés phénoliques et flavonoïdes ont été extraits à partir des feuilles de cette plante par deux méthodes différentes : Extraction par macération dans le méthanol aqueux, et extraction liquide/liquide dans trois solvants de polarités croissantes, l'éther de pétrole, le dichlorométhane et l'éthanol [137].

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

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale dans le méthanol aqueux pour extraire les principes actifs des écorces de grenade. Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par des travaux antérieurs avec quelques modifications [138]. Le protocole de la macération de cette plante est le suivant (**Figure III.5**)

Une prise d'essai d'une masse de 20 grammes de poudre d'écorce de grenade a été macérés dans un mélange de MeOH à 80% et l'eau à 20% (v/v). Ce qui implique que 160ml de méthanol ont été mélangés à 40ml d'eau distillée dans un bécher de 500ml, dans lequel a été dispersée la poudre sous agitation énergique et continue pendant 24 h à température ambiante. Le bécher contenant le mélange a été recouvert d'un papier aluminium pour éviter toute



infiltration de la lumière, et fermé avec du parafilm pendant toute la durée d'agitation. A la fin, la solution macérée est filtrée au-dessus d'un entonnoir contenant un papier filtre. La solution filtrée (extrait brut) d'une couleur orange est transférée dans un erlen de 500 ml, hermétiquement fermé et enveloppé d'un papier aluminium pour une conservation à l'abri de la lumière (Image de **figure III.6**).



Figure III.5 : Procédés de macération.



Figure III.6 : Filtration.

a. Rendement de la macération

• Rendement de l'extraction par macération

Une prise d'essai de 20ml de filtrat a été prélevée et placée dans un récipient ouvert pour permettre l'évaporation des solvants sur un agitateur magnétique à température ambiante pendant 2 jours. Après une évaporation presque totale des solvants, le fond de la solution est ensuite transféré dans une boîte à pétri tarée et propre et sèche, pour poursuivre le séchage à l'air libre pendant 2 jours jusqu'à masse constante. A la fin, on poursuit le séchage dans une étuve réglée à 50 °C pendant 2h, pour permettre à la solution de s'évaporer complètement. A la fin, la boîte à pétri est pesée, et la masse du résidu sec de macération est déterminé en utilisant la relation suivante :

$$M (\text{résidu sec}) = P_f - P_0$$

P_f : poids final après séchage (tare + résidu sec)

P₀ : poids initial de la boîte à pétri vide.

D'où on calcule la masse de l'extrait M (extrait sec) pour le volume total V de la solution de macération, qui nous permet de déterminer le rendement de l'extraction.

$$M (\text{extrait sec}) = M (\text{résidu sec}). (V / 20)$$



Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée par **Falleh et al. [139]**.

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

- **R** : Rendement massique (%).
- **M_{ext}** : la masse de l'extrait sec après l'évaporation du solvant (g).
- **M_{éch}** : la masse de la poudre de l'échantillon de l'écorce de grenade.

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

- **Principe**

Une extraction est une opération qui consiste à extraire une espèce chimique du milieu qui le contient. Pour une espèce chimique dissoute dans un liquide (appelé solvant), on peut utiliser un autre liquide, appelé solvant d'extraction. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide.

Le choix du solvant obéit à trois critères et nécessite la connaissance d'un paramètre physique caractéristique de ce solvant :

- **Etat physique** : le solvant doit être liquide à la température et à la pression où l'on réalise l'extraction.
- **Miscibilité du solvant** : le solvant doit être non miscible à la phase qui contient initialement le composé à extraire.
- **Solubilité** : le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant. C'est-à-dire, beaucoup plus soluble dans le solvant que dans le milieu où il se trouve initialement (milieu aqueux en général).
- **Densité du solvant** : Il est nécessaire de connaître ce paramètre car c'est lui qui détermine si la phase organique, contenant le composé à extraire, se trouve au-dessus ou en dessous de la phase aqueuse (à éliminer) dans l'ampoule à décanter.

- **Méthode de séparation**

On utilise la méthode d'extraction dans différents solvants de polarité croissante :

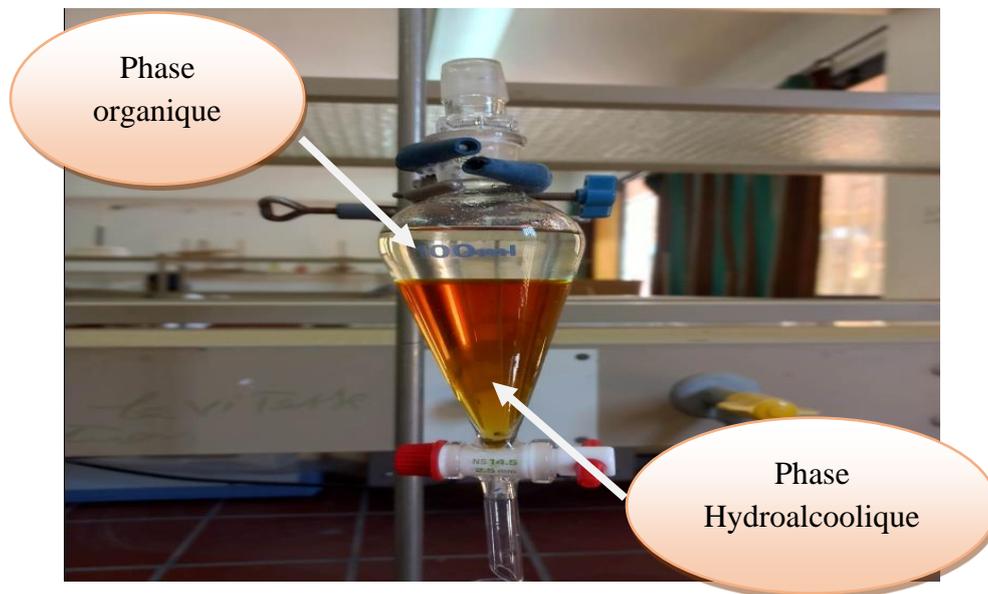
- a. **Extraction par l'éther de pétrole (EEP)**

- Dans une ampoule à décanter, on ajoute 50 ml de filtrat à 50 ml d'éther de pétrole (EP).



- On agite et on laisse reposer le mélange au moins 20 minutes jusqu'à l'obtention de deux phases, une phase organique ou l'hexane (supérieure) et une phase aqueuse (inférieure).
- La phase supérieure organique ou EEP de couleur rouge brique est transvasée dans un erlen de 250 ml.
- La phase inférieure aqueuse de couleur jaune est transférée dans un second erlen de 250 ml et conservée hermétiquement (**Figure III.7**).

Figure III.7 : Extraction par l'éther de pétrole.

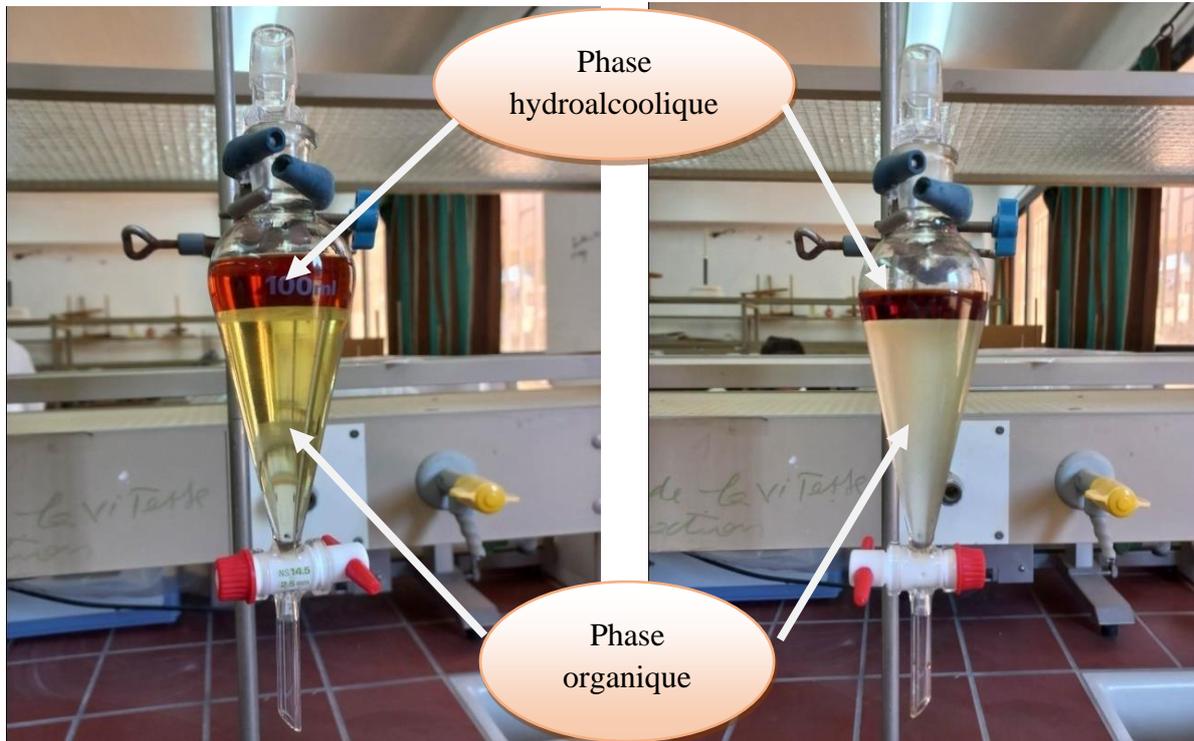


b. Extraction par Dichlorométhane :

- Dans une ampoule à décanter, on ajoute 50ml de la phase aqueuse récupérés dans la 1^{er} extraction à 50 ml de Dichlorométhane.
- On agite énergiquement et on retourne l'ampoule, on ouvre le robinet doucement et extrait les gaz. Puis on referme et on laisse reposer le mélange au moins 20 minutes jusqu'à l'obtention de deux phases, une phase organique ou Dichlorométhane (inférieure plus dense) qui est d'une couleur jaune et une phase aqueuse (supérieure) d'une couleur rouge brique.
- On récupère la phase organique dans un erlen de 250 ml (Extrait DCM).
- On répète la procédure deux fois (**Figure III.8**).



Figure III.8 : Extraction par le dichlorométhane.

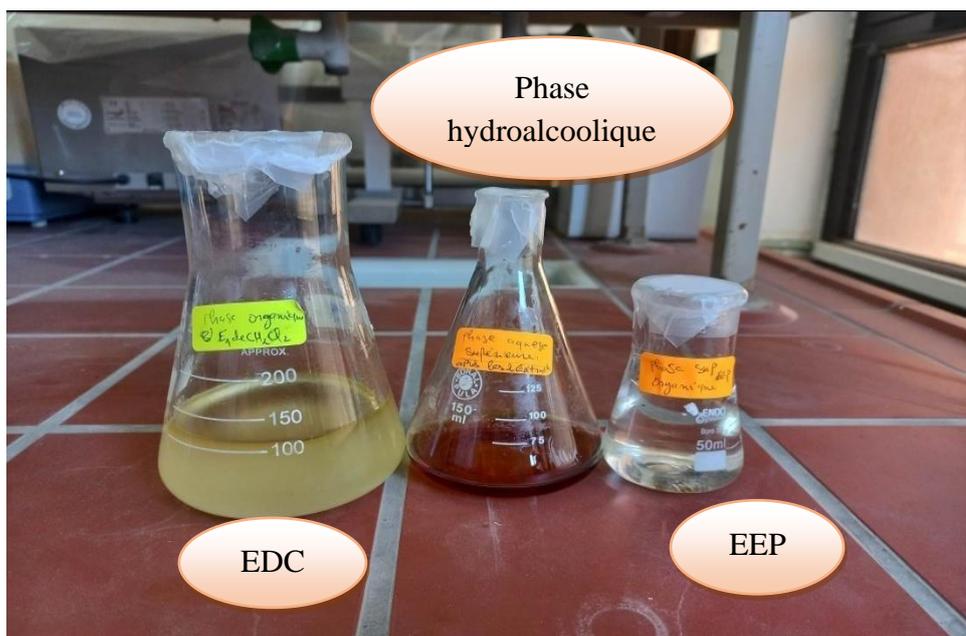


a) La première extraction

b) La deuxième extraction

✓ Les résultats de l'extraction liquide/liquide sont résumés dans la figure III.9 suivantes :

Figure III.9 : Résultat de l'extraction liquide-liquide.





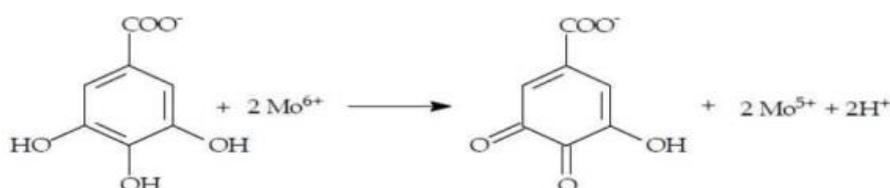
III.2.3. Analyse quantitative par spectroscopie UV-visible

a. Dosages des polyphénols

• Principe

Le dosage des polyphénols totaux, utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (**Figure III.10**) a été décrite en 1965 par Singleton et Rossi [140]. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diversifiées.

Figure III.10 : Principe de la réaction du réactif de Folin-Ciocalteu [141].



• Mode opératoire :

✓ Préparation des solutions :

- Solution mère d'acide gallique d'une concentration de 2mg /ml.
20mg d'AG dans 10ml d'eau distillée.
- Solution de Folin-Ciocalteu d'un volume de 1 ml dans 9ml d'eau distillée.
- Solution de carbonate de sodium d'une concentration de 0.075 mg/ml, 18.75g de Na₂CO₃ dissouts dans 250ml d'eau distillée.

✓ Préparation des étalons de l'Acide Gallique :

On prépare une série d'étalons par dilutions de la solution mère d'AG de concentration 2mg /ml, selon le tableau qui suit :

Tableau III.2 : Les dilutions de la solution mère d'AG.

Etalons	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Solution de mère d'AG (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Eau distillée (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3
Ce (mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12	0.14
Ve (ml)	0.4						
Folin (ml)	2						
Na ₂ CO ₃	1.6						

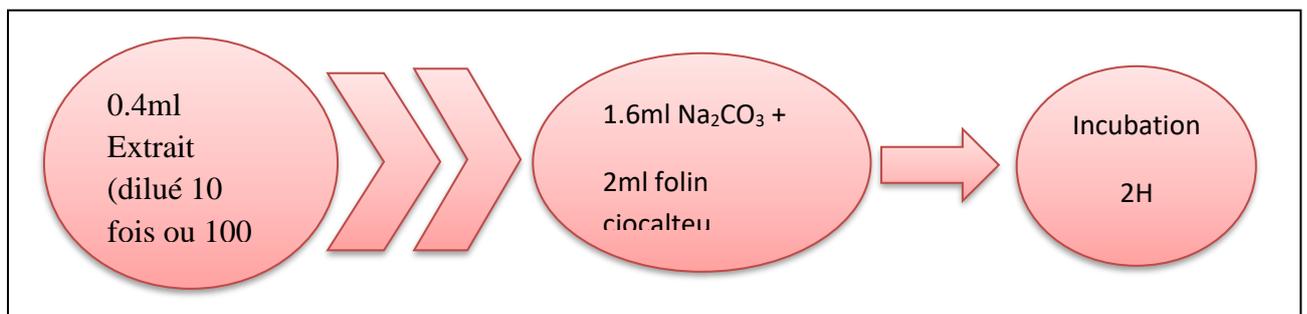


Puis on procède aux mélanges de 0.4 ml de chaque solution étalon (de E1 à E7), avec 2 ml de réactif de folin-Ciocalteu et 1.6 ml de solution de Na_2CO_3 . On agite chacune des solutions étalons, puis on laisse déposer pendant 2h pour développer la coloration bleue du complexe. On mesure par la suite les absorbances des solutions à 765 nm par rapport au blanc contenant 0.4 ml d'eau distillée + 2 ml de Folin-Ciocalteu et 1.6 ml de carbonate de sodium, préparé dans les mêmes conditions que les étalons.

✓ Dosage de l'extrait :

On doit d'abord diluer la solution d'extrait concentré, puis préparer la solution diluée pour le dosage des polyphénols, selon le schéma qui suit :

Figure III.11 : Schéma des étapes de la préparation d'échantillon de l'extrait de l'écorce de grenade.



Le lecteur de l'absorbance a été réalisée au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 765 nm contre un blanc constitué de 2 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10 et de 1.6ml de la solution Na_2CO_3 plus 0.4ml d'eau distillée.

b. Dosage des flavonoïdes

• Principe

Le dosage des flavonoïdes se fait à l'aide des réactifs suivants :

- La quercétine ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) qui est un composé organique de couleur jaune.
- Le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) qui est un sel de couleur blanche.

Le mélange des deux, abouti à la formation d'un complexe jaune qui absorbe à 430 nm.

Figure III.12 : Formule chimique de la Quercétine.

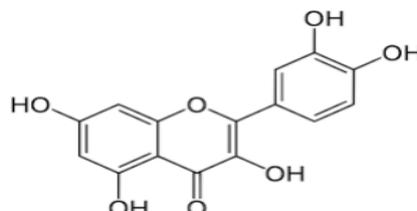
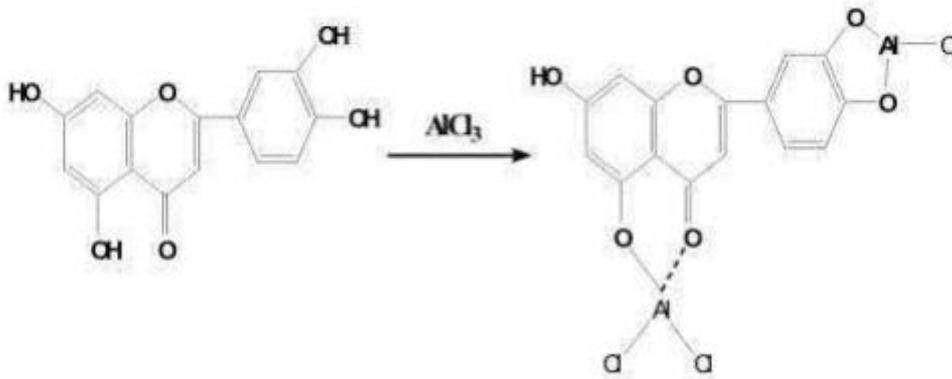




Figure III.13 : Schéma de réaction des flavonoïdes avec chlorure d'aluminium.



- **Mode opératoire :**
 - ✓ **Préparation des deux solutions :**
 - Solution de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ à 2%
2g de sel $AlCl_3$ sont dissous dans 100 ml de MeOH
 - Solution mère de quercitrine
On dissout une prise d'essai de 15mg de quercétine dans 7.5 ml de MeOH.
 - ✓ Préparation des étalons de Quercétine de concentration 2mg/ml. On doit effectuer une série de dilutions de la solution mère de Quercétine, pour préparer les étalons.

Tableau III.3 : Préparation des étalons de Quercétine.

Etalons	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Solution de mère Qr (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1	1.5
MeOH (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9	8.5
Ce (mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2	0.3
Ve(ml)	0.4						
$AlCl_3$ (ml)	2						
Ce'(ug/ml)	3.33	6.66	9.99	13.32	16.65	33.3	49.95
A (430nm)	0.195	0.828	0.791	1.006	1.032	2.447	2.873

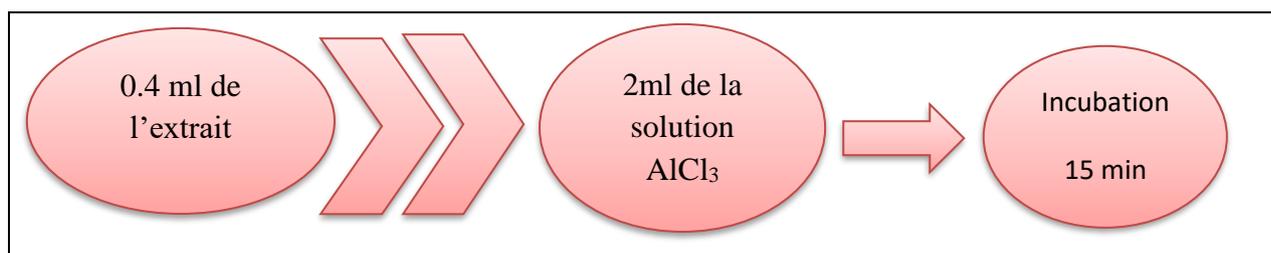
Ensuite, on doit effectuer les mélanges de 0.4 ml prélevé de chacun des étalons (de E1 à E7), avec 2 ml de solution de $AlCl_3$ dans différents tubes à essai.

On agite puis on laisse au repos pendant 15 min pour développer la couleur jaune du complexe stable, avant de mesurer les absorbances des étalons à 430 nm, par rapport au blanc.

- ✓ Préparation de l'échantillon de l'extrait :



Figure III.14 : Schéma des étapes de préparation de l'échantillon.



On prépare le blanc contenant seulement 0.4 ml de Méthanol mélangé avec 2 ml d' AlCl_3 .

- La lecture de l'absorbance a été réalisée au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc.

III.2.4. Activité antioxydant par méthode de DPPH

- **Principe**

Le composé utilisé pour la mesure du dosage des antioxydants est le DPPH qui est un radical libre azoté organique avec une couleur purple foncé. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à un antioxydant, sa couleur passe du violet au jaune de l'hydrazine correspondante. Sa formule chimique (2, 2-diphényl 1-picrylhydrazyle) ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$). Ce composé est utilisé pour le dosage des antioxydants. Sa synthèse chimique représentée ci-dessous :

Figure III.15 : Représente la formule globale du DPPH.



- **Mode opératoire**

- Préparation de la solution DPPH de concentration de 0.036 mg /ml

On dissout une prise d'essai de 2 mg de DPPH pur avec le MeOH dans une fiole de 50ml, on complète au trait de jauge avec le solvant.

- Préparation des solutions diluées de l'HE

On réalise deux dilutions de chaque extrait concentré dans le MeOH



Tableau III.4 : Les dilutions de l'huile essentielle.

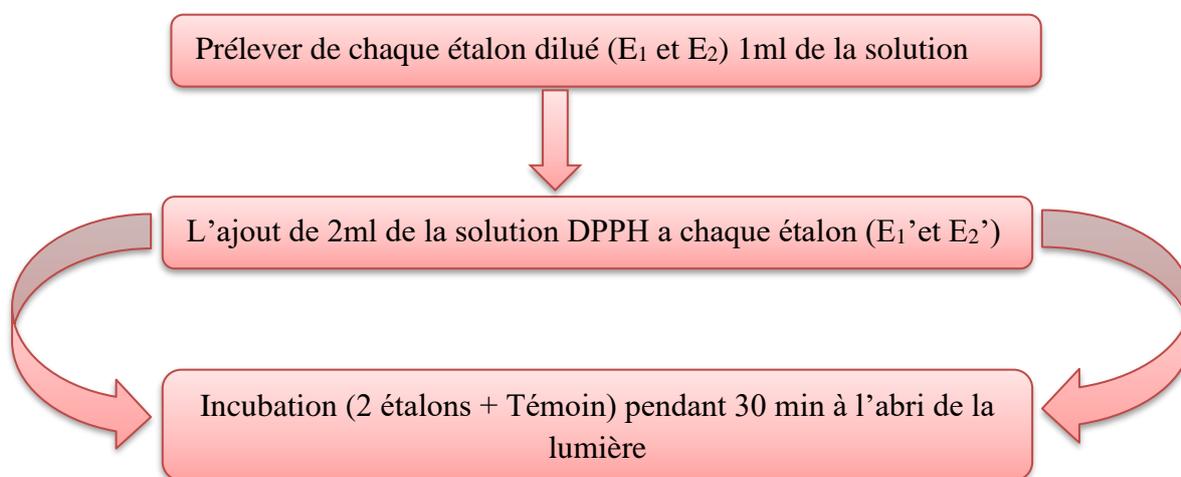
Solution diluée de HA, EDCM, EEP, Extrait	E1	E2
HE (ul)	100	800
MeOH (ml)	1	1

Dans cette étape, on a associé le pouvoir d'inhibition antioxydant des huiles essentielle avec un témoin qui se compose d'un mélange de (1ml de MeOH + 2ml de solution de DPPH).

Ainsi, 1 ml de chacune des solutions diluées de l'extrait des HE est mélangé à 2 ml de DPPH. On laisse agir pendant 30 min, puis on procède à la mesure des absorbances à 517 nm par rapport au blanc (méthanol).

L'absorbance de la solution témoin doit être mesurée de la même manière que les solutions diluées des HE.

Figure III.16 : Schéma des étapes de dilutions de l'extrait HE et de mesure de l'activité Anti-oxydante par le DPPH.



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

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

Inhibition %: pourcentage d'inhibition des radicaux libres.

Abs Témoin : absorbance du Témoin.



Abs échantillon : Absorbance de la solution contenant l'échantillon.

III.2.5. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC

- **Principe et méthode**

L'analyse est réalisée par une technique HPLC (UHPLC+ focused, Ultimate 3000 autosampler column compartiment).

Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige le remplacement des méthodes traditionnelles par des techniques séparatives. L'HPLC est sans doute la technique analytique la plus utile pour caractériser les composés polyphénoliques [142].

- **Mode opératoire**
 - ✓ **Préparation de la phase mobile**

La phase mobile est composée de trois solvants polaires : l'eau distillée, méthanol et l'acide acétique (47ml, 50ml, 2.5ml) respectivement.

- ✓ **Préparation des standards ($V_t= 2ml$) :**
 - Acide gallique (2mg/ml)

Un volume 0.1ml d'AG est mélangé à un volume 1.9ml de la solution phase mobile.

- Quercitine (1mg/ml)

Un volume 0.2ml de quercitine est mélangé à 1.8ml de la solution phase mobile.

- ✓ **Préparation des extraits :**

0.2ml de chaque extrait (extrait brute E 20F, HA, EDCM,) est ajouté à 1.8ml de la phase mobile.

- **Préparation des viols**

0.1 ml de chaque extrait + 9.5ml de la phase mobile ont été injectés dans une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm. Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique pour un temps d'analyse de 20 min. Le débit est



de 1 ml / min [143]. La détection a été effectuée par un détecteur UV à une longueur d'onde égale 250nm. Les conditions opératoires sont les suivantes :

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

III.3. Micro encapsulations

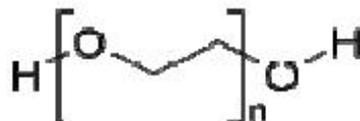
III.3.1. Présentation des matières premières

a. Les polymères

- **Le polyéthylène glycol (PEG)**

Le polyéthylène glycol est un polymère linéaire appartenant à la famille des polyéthers non-ionique, c'est un thermoplastique cristallin la chaîne de PEG est inerte d'un point de vue chimique alors que les groupements hydroxyles terminaux peuvent être exploités pour la synthèse de copolymères. Les PEG ont des poids moléculaires moyens compris entre 2000 et 20000, ils sont généralement produits par polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène avec une étape de terminaison, afin de donner des polyéthers. Le PEG présente des propriétés physico-chimique et biologiques uniques, y compris la solubilité aqueuse illimitée indépendamment de sa masse moléculaire, biocompatibilité avec une faible degré d'immunogénicité et la non biodégradabilité [144].

Figure III.17 : Représentation de la formule chimique du polyéthylène glycol.



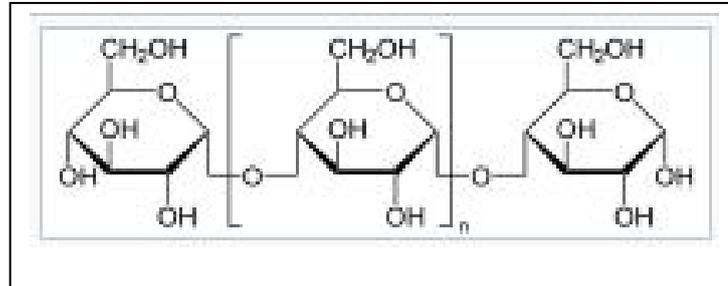
- **Dextrine**

C'est un polymère de la famille des polysaccharides d'origine naturelle. C sont des glucides amorphes de formule brute $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ [145].



On les trouve sous forme de poudre blanche, jaune ou brune. Elles sont plus ou moins solubles dans l'eau et donnent des solutions incolores.

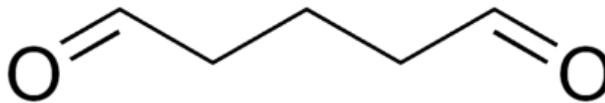
Figure III.18 : Représentation de la formule chimie de la dextrine [145].



- **Tension active (glutaraldéhyde)**

Le glutaraldéhyde est utilisé pour la fixation des tissus en microscopie optique et électronique. Par exemple, il permet de fixer les protéines avant la coloration lors d'électrophorèses SDS-PAGE. Il est aussi utilisé comme intermédiaire de « cross-linking » (ou réticulation) intermoléculaire entre protéines [146] et comme tensioactif neutre.

Figure III.19 : Représentation de la formule chimique du glutaraldéhyde.



b. Huile de vaseline

La vaseline est un mélange d'hydrocarbures obtenus par purification des fractions lourdes de certains pétroles. C'est un mélange d'alcane, composée d'hydrocarbures linéaires et dont la formule brute est C_nH_{2n+2} , avec n entre 15 et 50.

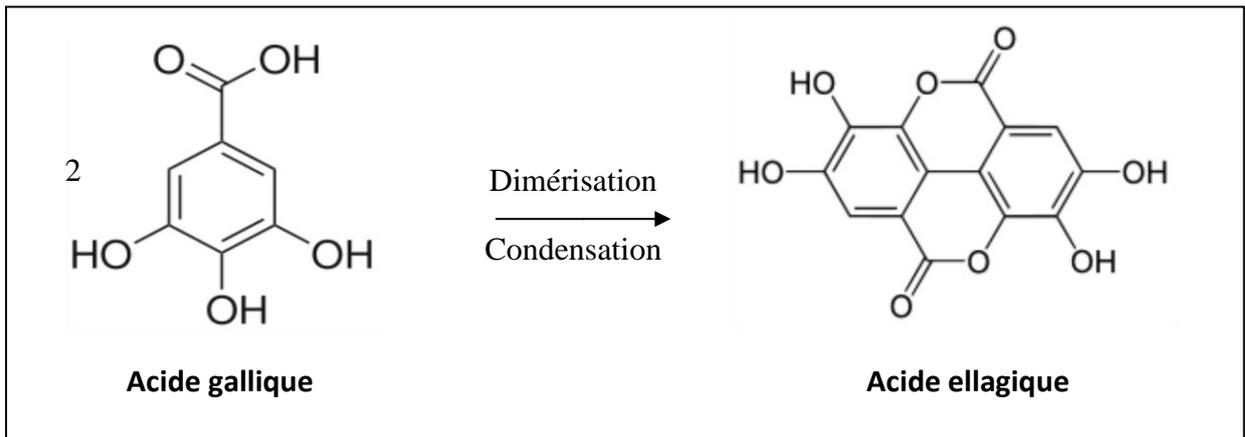
c. Principe active (Acide gallique, Acide ellagique)

L'extrait brut est plus riche en acide ellagique et gallique que les autres extraits d'après l'analyse de HPLC. Acide ellagique et gallique présentent comme de principe actif de l'écorce de grenade.

L'acide ellagique est un polyphénol antioxydant présent dans de nombreux fruits et légumes tels que châtaignes, framboises, fraises, canneberges, noix, noix de pécan, grenades. Il a de nombreuses vertus pharmacologiques.



Figure III.20 : Schéma de la réaction de dimérisation de l'acide gallique en acide ellagique.



III.3.2. Préparation des milieux physiologiques

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

$$m_{\text{HCL}} = C \cdot V \cdot M \longrightarrow m_{\text{HCL}} = 0,365 \text{ g de HCl pur}$$

$$M = 36,5 \text{ g/mole}$$

$$\text{Pureté} = 37\% , \quad \text{Densité} = 1,18 , \quad \text{Masse volumique } (\rho) = 1,18 \text{ g/cm}^3$$

$$37 \text{ g de HCl} \longrightarrow 100 \text{ g de solution concentrée}$$

$$0,365 \text{ g de HCl} \longrightarrow m_{\text{HCl}} \text{ concentré}$$

$$m_{\text{HCl}} = 0,98 \text{ g}$$

$$\rho = \frac{m_{\text{HCl}}}{V}$$

$$V = \frac{m_{\text{HCl}}}{\rho}$$

$$V = 0,83 \text{ ml}$$

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

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

$$M = 40 \text{ g/mole}$$

$$\text{Pureté} = 98\%$$

$$m_{\text{NaOH}} = C \cdot V \cdot M \longrightarrow m_{\text{NaOH}} = 0,4082 \text{ g}$$



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

✓ Préparation tampon pH = 4

On mesure d'abord le pH de l'eau distillée avec le pH- mètre étalonné à 4, on réajuste la valeur du pH en ajoutant quelques gouttes de solution HCl à 0.1N pour obtenir un pH= 4.

✓ Préparation tampon pH=8

On ajoute à l'eau distillé ($\text{pH}_{\text{eau distillé}}=5.47$) quelque goutte de NaOH jusqu'à arriver à $\text{pH}=8$.

✓ Préparation tampon pH=6

On ajoute à l'eau distillé ($\text{pH}= 5.4$) quelque goutte de NaOH jusqu'à arriver à $\text{pH}=6$

III.3.3. Optimisation des paramètres de préparation des microparticules

L'objectif de cette étude est de déterminer les conditions optimales de préparations des microparticules par l'utilisation de la méthode des plans d'expériences (plan factoriel). Le tableau III.4 représente les volumes d'extraits brut d'écorces, les masses des polymères qui ont été ajoutés à chaque essai du plan d'expérience.

Tableau III.5 : Les différentes masses de PEG, de dextrine et volumes d'extrait brut d'écorces de grenade utilisées pour les essais du plan d'expérience factoriel.

Essai	Volume d'extrait d'écorce de grenades (ml)	Masse de Dextrine (mg)	Masse de PEG (mg)
1	2	300	150
2	4	300	150
3	2	300	50
4	4	300	50
5	2	300	150
6	4	300	150
7	2	300	50
8	4	300	50
9	3	300	75
10	3	300	75

- ✓ On a choisi d'étudier trois facteurs différents, la dose de PA, le rapport de polymère, le pH. Les variables codées sont présentées dans le **tableau III.6**, tandis que la matrice du plan factoriel de l'ensemble des dix essais est représentée par le **tableau III.7**.



Tableau III.6 : Variables codées et réelles des facteurs.

Facteur indépendant	Niveau		
	-1	0	1
Dose de PA en mg (X1)	86.4	129.6	172.8
Rapport de polymère (X2)	2	4	6
Ph (X3)	4	6	8

La matrice du plan d'expérience est représentée dans le **tableau III.6**.

Tableau III.7 : Matrice du plan d'expérience factoriel pour les essais de micro-encapsulation de l'extrait brut de l'écorce de grenade dans les polymères Dex/PEG.

Essai N°	X1	X2	X3	Dose (mg)	Rp	pH
1	-1	-1	-1	86.4	2	4
2	1	-1	-1	172.8	2	4
3	-1	1	-1	86.4	6	4
4	1	1	-1	172.8	6	4
5	-1	-1	1	86.4	2	8
6	1	-1	1	172.8	2	8
7	-1	1	1	86.4	6	8
8	1	1	1	172.8	6	8
9	0	0	0	129.6	4	6
10	0	0	0	129.6	4	6

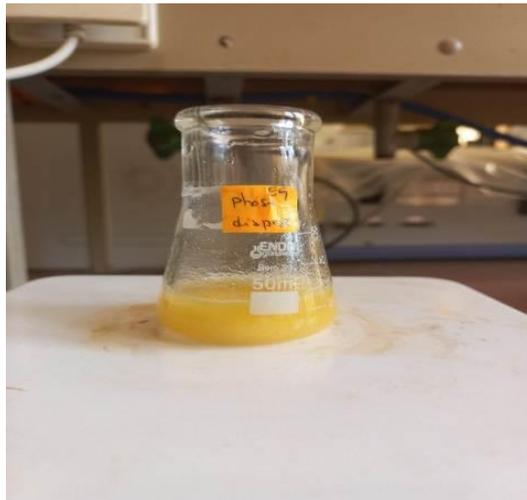
III.3.4. Mode opératoire de la préparation de la micro encapsulation

a. La phase dispersée

On fait dissoudre dans un erlenmeyer 300 mg de dextrine, on ajoute 10 ml de l'huile vaseline à l'aide d'une éprouvette de 20 ml, on laisse le mélange sous agitation (500tour/min), pendant 5 min pour bien homogénéiser la solution puis on l'ajoute PA à différentes concentrations (voir plan expérience) (**Figure III.21**).



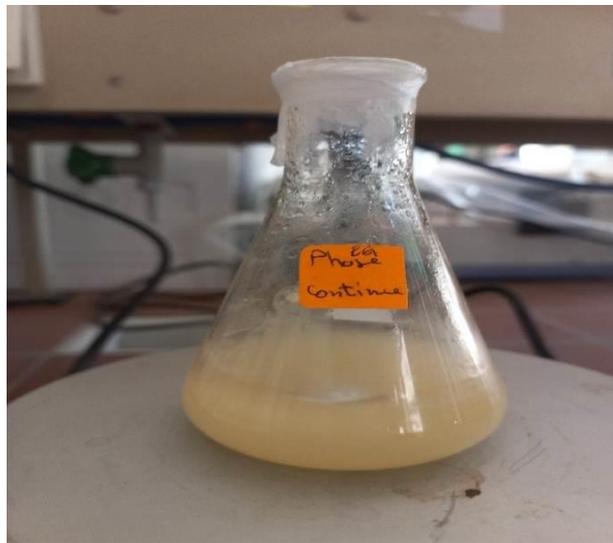
Figure III.21 : La phase dispersée.



b. La phase continue

On fait dissoudre dans un erlenmeyer propre les différentes masses de polymère PEG (suivi plan expérience), on l'ajoute 20ml de tampon à différentes ph (voir plan expérience) on le laisse sous agitation pendant 2 min puis on l'ajoute 0.2 ml de tension active (glutaraldéhyde) (Figure III.22).

Figure III.22 : La phase continue.



c. Emulsification

On prélève à l'aide d'une seringue de 5 ml propre toute la phase dispersée et on la verse rapidement dans la phase continue sous agitation 600 tour/ min à température



ambiante pendant 2h pour former une double émulsion. Après 2h on récupère deux couches.

Ensuite, on filtre l'émulsion à l'aide de papier wataman puis on récupère le filtrat dans un tube bien fermé qui sera dosé par UV- visible (dosage polyphénols totaux et dosage flavonoïdes totaux), et on obtient une suspension laiteuse qui va être laissée sécher à l'aire libre (**Figure II.23**).

Figure III.23 : Filtration.



III.3.5. Techniques de caractérisation

La méthode a été utilisée pour caractériser les microcapsules obtenues. Le spectrophotomètre UV-visible.

a. Le spectrophotomètre UV-visible

- **Totaux polyphénols**

0.4 ml de chaque essai (dilué avec l'éthanol 200 fois), on ajoute 2 ml de folin-Ciocalteu et 1.6 ml de solution Na_2CO_3 . Après 2h d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 765 nm par rapport à un blanc (sans extrait).

- **La dilution des filtrats (200F)**

On a fait d'abord la 1^{ère} dilution : 0.1 ml de filtrat avec 4.9 ml d'éthanol.

La 2^{ème} dilution : dans la 1^{ère} dilution on prélève 1 ml de filtrat dilué on ajoute 3 ml de l'éthanol.



- **Totaux flavonoïdes**

0.4 ml de chaque essai (filtrat) avec 2 ml de la solution $AlCl_3$. Après 15 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm par rapport à un blanc (sans extrait).

III.4. Etude de la cinétique de libération

III.4.1. Matériel utilisé

- **Microcapsules de polymère contenant l'extrait**

Les microparticules utilisées pour suivre la libération in vitro de l'extrait sont celles obtenues dans l'essai 4 (on a choisi l'essai 4 d'après les analyses UV-visible et HPLC).

- **Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)**

L'hydroxyde de sodium utilisé dans ce travail pour préparer les milieux physiologiques est fourni par Biochem chemopharma (Montréal, Québec).

- **Hydroxyde de sodium (NaOH)**

L'hydroxyde de sodium utilisé dans ce travail pour préparer les milieux physiologiques est fourni par Biochem Chemopharma (Montréal, Québec).

III.4.2. Préparation du milieu physiologique

Le milieu physiologique intestinal (pH=6.8) a été préparé en utilisant une solution tampon de phosphate par dissolution de 6.8g de phosphate mono potassique dans 250ml d'eau distille, mélange à 77ml de la solution NaOH (0.2M), et on complète à 1 litre l'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à 6.8 avec la solution NaOH (2N), par contrôle du pH avec un pH-mètre étalonné de type Hanna.

III.4.3. Protocole expérimental

L'essai de dissolution est réalisé dans un dissolu-test à godet de 900 ml muni d'un système d'agitation dans lequel est introduite la solution du milieu physiologique maintenu à une température de $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, et à une agitation de 50 tr/min. On dissout une masse de 100mg de les microparticules (essai 4) dans les godets des milieux physiologiques, et on effectue des prélèvements de 1ml à l'aide de la seringue de 5ml suivant des intervalles de temps choisis, en remettant à chaque fois 3ml du milieu physiologique d'après le tableau suivant. Les prélèvements sont filtrés par filtra-seringue puis dosés par spectrophotométrie UV-visible.



Tableau III.8 : Temps et le volume de la cinétique de libération de principe actif

T (min)	2	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
V _p (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V _{pH=6.8} (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Figure III.24 : Installation du dissolu test mise en œuvre pour l'étude de la cinétique de Libération



III.5. Caractérisation par infrarouge IRFT

La spectrophotométrie infrarouge est une technique d'analyse qualitative et quantitative, utilisée pour l'identification des groupements fonctionnels des composés, qui sont caractérisés par leurs bandes d'absorption. Elle consiste à soumettre la molécule au rayonnement IR.

Dans notre étude, l'ensemble des spectres IR ont été enregistrée à l'aide d'un appareil spectrophotométrie infrarouge de modèle SHIMADZU FT IR-8400S, piloté par un ordinateur muni d'un logiciel.

- **Protocole**

L'analyse se fait sur des échantillons sous forme des pastilles préparées sous une pression de 70 KN pendant 2 min, avec un mélange de 80 mg de KBr sec et 2 mg pour (résidu, extrait sec, microparticule, dextrine, PEG).

Chapitre IV : Résultats et Discussion





Chapitre IV

Résultats et discussion

Nous présentons les résultats essentiels de notre étude consacrée à l'extraction, à la phytochimie et aux propriétés antioxydantes des extraits d'écorces de grenade (*Punica Granatum*). Par la suite, nous ferons une discussion suivie de l'interprétation des résultats de l'encapsulation de l'extrait le plus enrichi en métabolites secondaires, tels que les polyphénols et les flavonoïdes, et de la cinétique de libération de ces derniers dans le milieu physiologique intestinal, qui représente l'un des principaux sites d'absorption et d'action des principes actifs.

IV.1. Extraction

IV.1.1. Calcul du rendement massique

L'extrait est obtenu à partir d'écorces de grenade (*Punica Granatum*) par macération. Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage de masse d'extrait sec par rapport à la masse initiale de matière végétale, tel que :

$$R\% = \frac{M_{ext}}{M_p} \times 100 = \frac{9.364g}{20g} \times 100$$

$$R = 46.82\%$$

Le rendement d'extraction massique est très élevé, ce qui montre que les écorces de grenade (*punica granatum*) choisies sont riches en métabolites secondaires, conformément aux travaux cités dans la littérature.

IV.2. Etude phytochimique

IV.2.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible

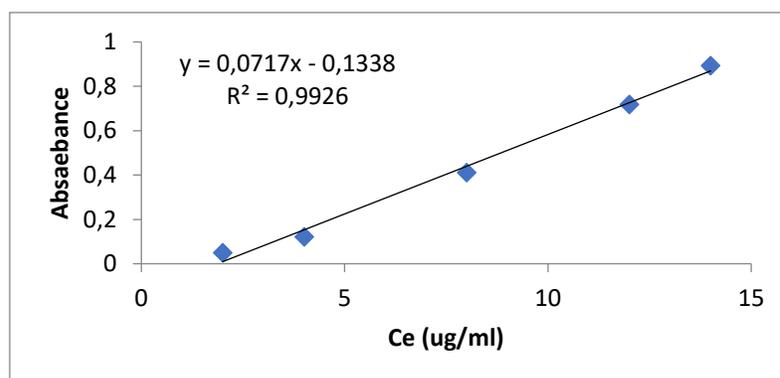
a. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux extraits sont quantifiés en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique est utilisé comme étalon, et les absorbances des solutions étalons sont mesurées à une longueur d'onde de 765 nm. Une courbe d'étalonnage a été établie, montrant une relation linéaire avec un coefficient de régression linéaire $R^2=0.992$ (**Figure IV.1**). L'équation de cette courbe est la suivante :

$$Y = 0.0717 X - 0.1338$$



Figure IV.1: Courbe de dosage des polyphénols totaux.

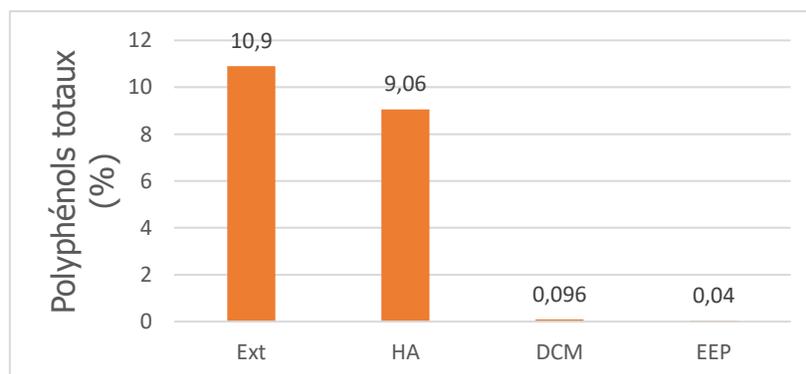


Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec. Les extraits de la plante ont révélé une richesse en polyphénols totaux, cependant les quantités variaient d'un extrait à l'autre, après extraction liquide-liquide dans les différents solvants d'extraction.

La figure IV.2 indique que l'extrait(E) brut présente la plus forte teneur en polyphénols (**10.9mg Eq AG/ g Ex Sec**), suivi par la phase hydroalcoolique (HA) (**9.06mg Eq AG/ g Ex Sec**), ensuite par l'extrait dans le dichlorométhane (DCM) (**0.096mg Eq AG/g Ex sec**), et enfin l'extrait dans l'éther de pétrole (EEP) (**0.04mg Eq AG/ g Ex Sec**).

La teneur en polyphénols des extraits de plantes peut être influencée par différents facteurs, tels que la variété de la plante, le climat, la localisation géographique, les maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante, la température et le solvant d'extraction [147].

Figure IV.2: Histogramme de variation des teneurs en polyphénols totaux dans les extraits des écorces de grenade (Punica Granatum).





Nous remarquons que la teneur en composés phénoliques dans les extraits de plantes dépend de la polarité du solvant d'extraction. Les phénols ont une solubilité élevée dans les solvants polaires, tels que l'eau, l'éthanol, le mélange de ces deux solvants dans l'extrait brut (E) et après extraction liquide-liquide dans le mélange Eau –Ethanol (HA). Ce qui entraîne une concentration significativement plus élevée de ces composés dans les extraits obtenus avec des solvants très polaires. Par contre, dans les solvants les moins polaires comme le dichlorométhane (DCM) et surtout l'éther de pétrole (EP), les teneurs en polyphénols sont 100 fois plus faibles que dans les solvants les plus polaires.

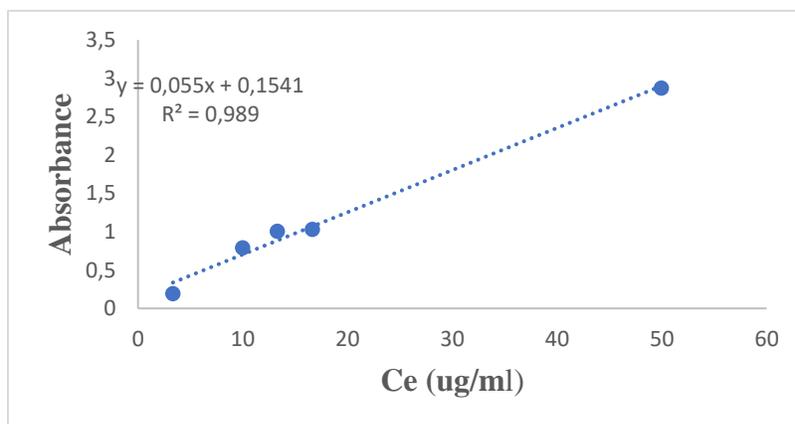
b. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été quantifiés en utilisant la méthode de complexation avec du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Des solutions de quercétine à des concentrations variées ont été utilisées comme étalons pour établir une courbe d'étalonnage. Les absorbances des étalons de quercétine ont été mesurées à une longueur d'onde de 430 nm.

L'équation suivante a été utilisée pour tracer la courbe d'étalonnage à partir des résultats obtenus pour la quercétine (**figure IV.3**) :

$$Y=0.055x-0.1541$$

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

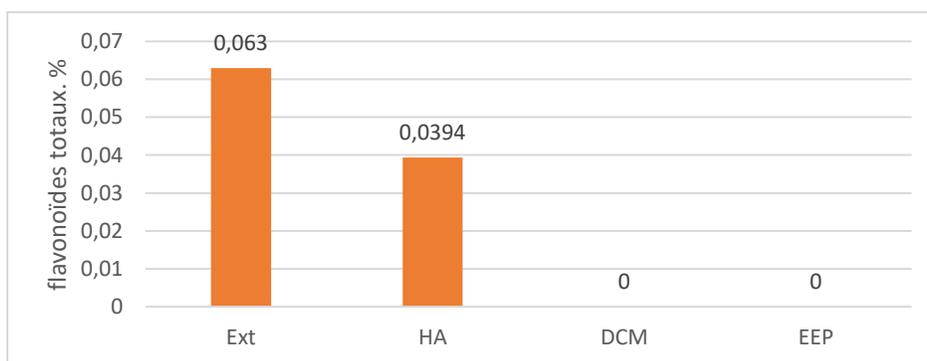


En utilisant cette courbe d'étalonnage, il a été possible de déterminer la quantité totale de flavonoïdes dans les feuilles de la plante étudiée, exprimée en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec.



Les résultats obtenus, présentés dans la **figure (IV.4)**, indiquent une variation considérable des teneurs en flavonoïdes entre les différents extraits. L'extrait brute (E) présente la teneur maximale en flavonoïdes (**0.063mg Eq Q / g Ex Sec**), suivi de près par la phase hydroalcoolique (HA) qui présente une teneur inférieure à la précédente valeur (**0.0394 mg Eq Q / g Ex Sec**). Les extraits d'éther de pétrole (EEP) et de Dichlorométhane (DCM) renferment soit des quantités négligeables ou bien ne contiennent pas de flavonoïdes.

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



Il a été observé que la teneur en flavonoïdes des extraits de la plante varie en fonction de la polarité des solvants utilisés lors de la préparation des extraits, comme l'ont montré les précédents travaux réalisés par plusieurs auteurs [148]. En complément, il convient de souligner que plusieurs facteurs influencent le taux de flavonoïdes dans les extraits de grenade, qui dépendent de l'espèce, des conditions de croissance et de la méthode d'extraction.

IV.2.2. Activité antioxydante par la méthode de DPPH

L'analyse de l'activité antioxydante des extraits d'écorce de grenade a révélé des taux d'inhibition variables de l'effet oxydatif. Les résultats correspondants sont regroupés dans le **tableau IV.1**.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est une mesure de l'activité antioxydante d'un composé ou d'un extrait. Plus le pourcentage d'inhibition est élevé, plus l'activité antioxydante est forte. Dans notre tableau IV.1, nous avons indiqué les pourcentages d'inhibition pour les différents extraits à deux concentrations différentes (100 µl et 800 µl).



Tableau IV.1 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les extraits des écorces de Punica Granatum.

Extraits	Extrait brut	HA	DCM	EEP
Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH. %(100ul)	88.28	85.15	85.93	1.95
Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH. %(800ul)	83.59	86.71	87.5	11.32

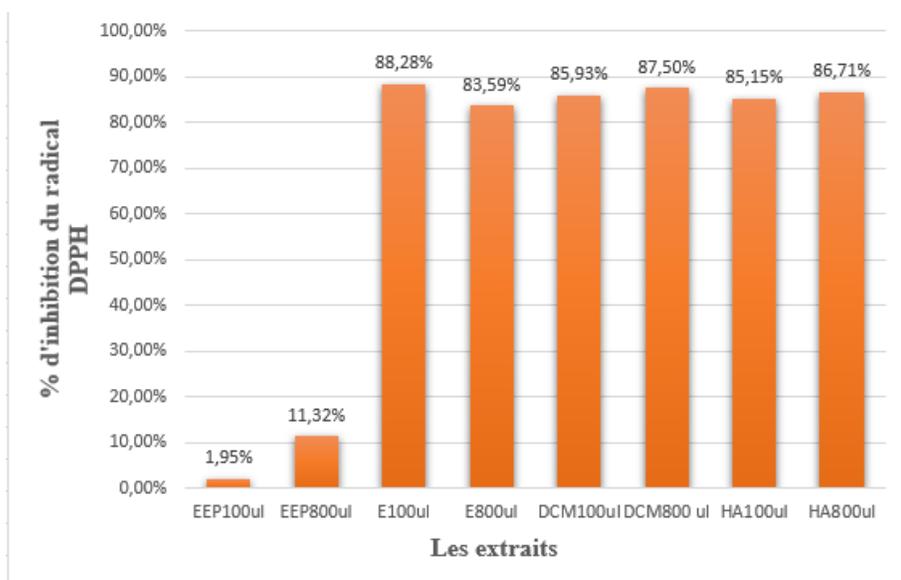
Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente avec la concentration des extraits (HA), (DCM) et (EEP), sauf dans le cas de l'extrait brut (E) qui diminue de 88,28% pour 100 μ l à 83,59% pour 800 μ l. Cependant, la meilleure activité anti-oxydante à 100 μ L été obtenue pour l'extrait brut (E) à 100 μ L (**Figure. IV.5**), avec un taux d'inhibition maximal de 88,28%. Ceci est due probablement à l'existence d'autres métabolites secondaires comme les tanins condensés et hydrolysables, qui sont probablement beaucoup plus présents dans l'extrait de DCM. Ce qui explique des taux d'inhibition élevés malgré des teneurs plus faibles en polyphénols et en flavonoïdes.

Les plus faibles taux d'inhibition ont été réalisés dans les extraits de EEP (1,95 et 11,32%), dû à des teneurs plus faibles en polyphénols et en absence des flavonoïdes qui favorisent l'activité anti-oxydante contre le stress oxydatif.

Ces variations peuvent être dues à plusieurs facteurs, tels que la composition chimique des extraits, les interactions entre les composés actifs, ou des effets spécifiques à chaque extrait. Il est important de noter que l'activité antioxydante peut être favorisée par de nombreux facteurs, et une seule mesure ne donne pas une image complète. Une analyse plus approfondie et des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre ces résultats contradictoires.



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



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

Deux composés phénoliques purs (acide gallique et quercétine) ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme des standards. Leur temps de rétention sont mentionnés dans le **tableau IV.2**

Les chromatogrammes de l'analyse HPLC sur colonne C18 (apolaire), des extraits d'écorce de grenade étudiée sont présentés sur le **tableau IV.3**. Différentes substances ont été identifiées dans nos extraits, par comparaison des chromatogrammes des échantillons avec ceux des substances pures des solutions standards.

Tableau.IV.2 : Les temps de rétention et aires des pics chromatographiques des standards par HPLC.

Standard	Temps de rétention (min)	Aire relative %
Acide gallique	1.700	11.019
Quercétine	5.232	64.752



Tableau IV.3: Temps de rétention et les aires des pics des métabolites secondaires identifiés dans les extraits par HPLC.

Métabolites secondaires	Extrait brut (E)		(HA)		(DCM)	
	Tr (mn)	Aire (mAU.mn)	Tr (mn)	Aire (mAU.mn)	Tr (mn)	Aire (mAU.mn)
Acide gallique	1.488	1835.675	1.510	2244.032	1.590	647.583
Acide Ellagique	3.142	542.692	3.127	214.428	3.173	276.141
Quercétine	-		-		5.963	1.111

Le tableau IV.4 présente les résultats de l'analyse HPLC de différents extraits, à savoir l'extrait brut, le HA (hydroalcoolique) et le DCM (Dichlorométhane). Les extraits ont été évalués en termes de concentration en polyphénols (acides gallique, acide ellagique) et en flavonoïdes (quercétine) en milligrammes par millilitre.

On a calculé les concentrations des extraits par rapport à chaque substance quantifiée d'après l'équation suivante :

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

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

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

C_e : concentration du standard (Quercétine : 1mg/ml, ou Acide gallique : 2mg/ml)

F : facteur dilution (2 fois pour Extrait brut, HA et DCM)

Tableau IV.4: Concentration des extraits d'écorce de grenade par HPLC.

	Les extraits	Extrait brut (E)	HA	DCM
Concentration (mg/ml)	Polyphénols : Acide gallique Acide ellagique	666.37 197.0	814.60 77.84	235.08 100.24
	Flavonoïdes : Quercétine	0	0	0.034



Dans notre étude, on a utilisé une phase stationnaire (colonne C18) apolaire, et une phase mobile constituée de solvants polaires et protiques (eau/ méthanol/ acide acétique) dans des proportions en volume 500ml : 470ml : 25ml (V/V/V).

L'ordre d'affinité est que les composés les plus polaires et protiques qui vont migrer en premier, avec des temps de rétentions plus faibles comme l'acide gallique, suivi de l'acide ellagique puis de la quercétine, selon aussi l'ordre croissant de leurs poids moléculaires. Par contre les composés les moins polaires ayant plus d'affinité vis-à-vis à la phase stationnaire vont migrer plus lentement, et avec des temps de rétentions plus grands, conformément au principe de la séparation chromatographique en phase inversée. L'acide ellagique est le dimère de l'acide gallique, qui est le produit de condensation par hydrolyse de celui-ci. Ce qui signifie que le temps de rétention de l'acide ellagique est pratiquement le double de celui de l'acide gallique. Par contre, la Quercétine de poids moléculaire beaucoup plus élevé et composé de plusieurs cycles aromatiques et de polarité proche de celle de l'acide gallique, est élue à un temps de rétention relativement plus élevé.

En ce qui concerne les polyphénols, on observe des concentrations très élevées dans l'extrait brut, avec une valeur de 666.37 mg/ml en acide gallique et environ 197 mg/L en acide ellagique, et dans l'extrait HA avec une concentrations supérieure en acide gallique de l'ordre 814.60 mg/ml et une concentration moins élevée en acide ellagique environ 77.84 mg/L. Tandis que l'extrait DCM affiche les valeurs des concentrations intermédiaires, de l'ordre de 235.08 mg/L de AG et de 100.24 mg/L de AE. Ces résultats indiquent que l'extrait brut est la plus riche en acide ellagique qui présente plus d'intérêt de vue action pharmacologique cible, tandis que le HA et le DCM en contiennent des quantités relativement inférieures.

Les flavonoïdes (Qr) sont peu présents dans l'extrait brut et HA, tandis que l'extrait DCM en contient de faibles quantités de l'ordre de 0,034 mg/ml.

Ces résultats révèlent que les extraits de l'écorce de Punica Granatum ne sont pas riches en flavonoïdes.

En résumé, l'analyse HPLC de ces extraits révèle que l'extrait brut est la source la plus concentrée en polyphénols (AG, AE), mais peu de flavonoïdes ont été décelés. Ces résultats soulignent l'importance de l'extrait brut comme une source potentielle de polyphénols, en



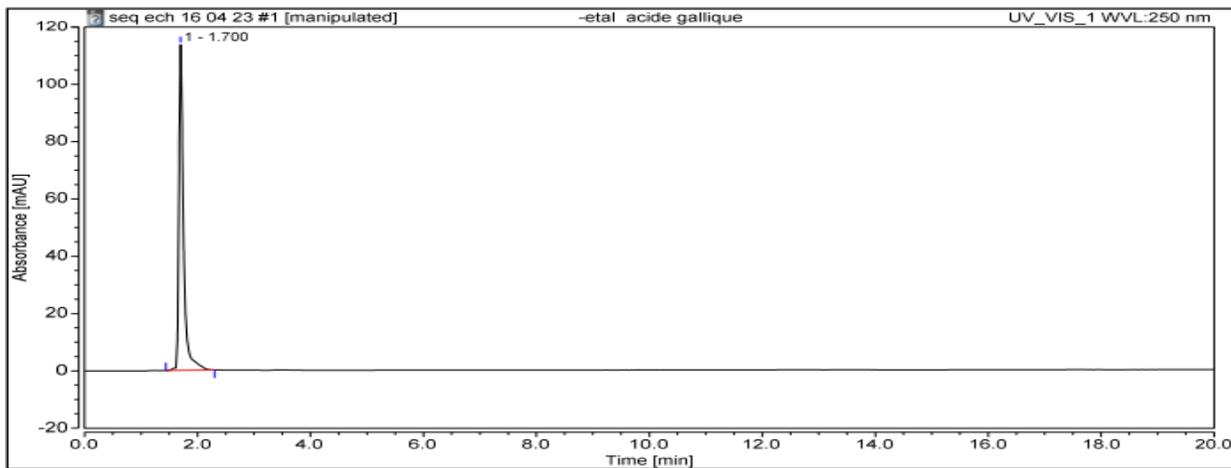
particulier l'acide ellagique, qui sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et bénéfiques pour la santé, notamment pour leurs effets curatifs envers des maladies cardiovasculaires.

✓ **Commentaire :**

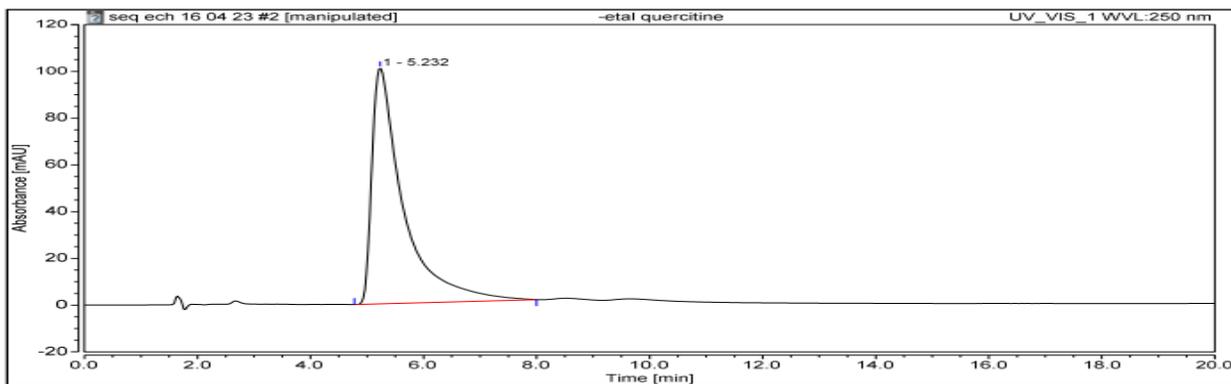
L'analyse HPLC présentée dans ce tableau offre des informations précises sur la composition des extraits étudiés. Les concentrations de polyphénols (AG, AE) et de flavonoïdes (Qr) dans les différents extraits ont été mesurées en milligrammes par millilitre.

Les résultats ont révélé une différence significative de concentration entre les extraits. L'extrait brut se distingue par des concentrations élevées de polyphénols (AG :666.37mg/ml ; AE :197 mg/L). Ce qui suggère une richesse en composés bioactifs. En comparaison, les deux extraits HA et DCM qui présentent des concentrations moins élevées en polyphénols.

Figure IV.6 : Chromatogrammes de HPLC des standards, acide gallique et quercétine.



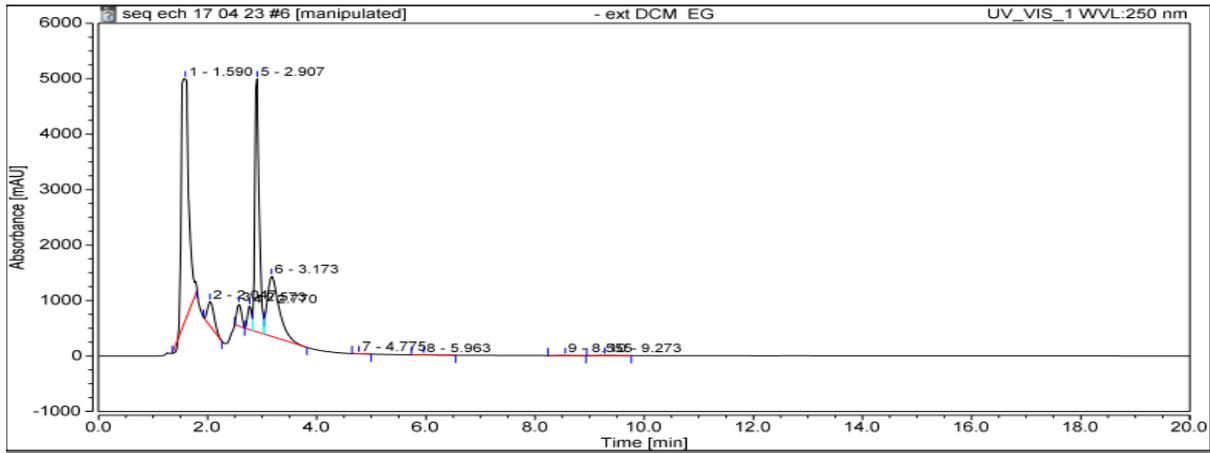
Acide gallique



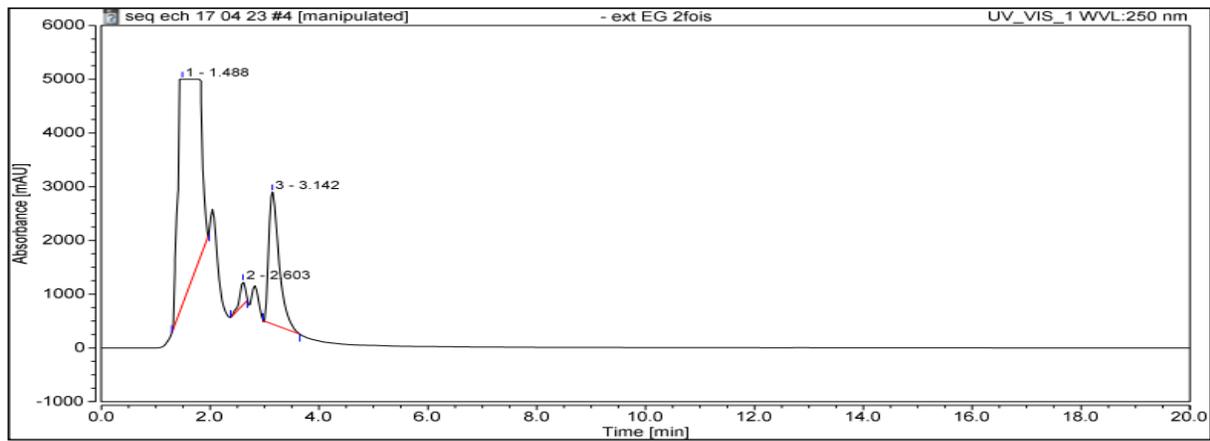
Quercétine



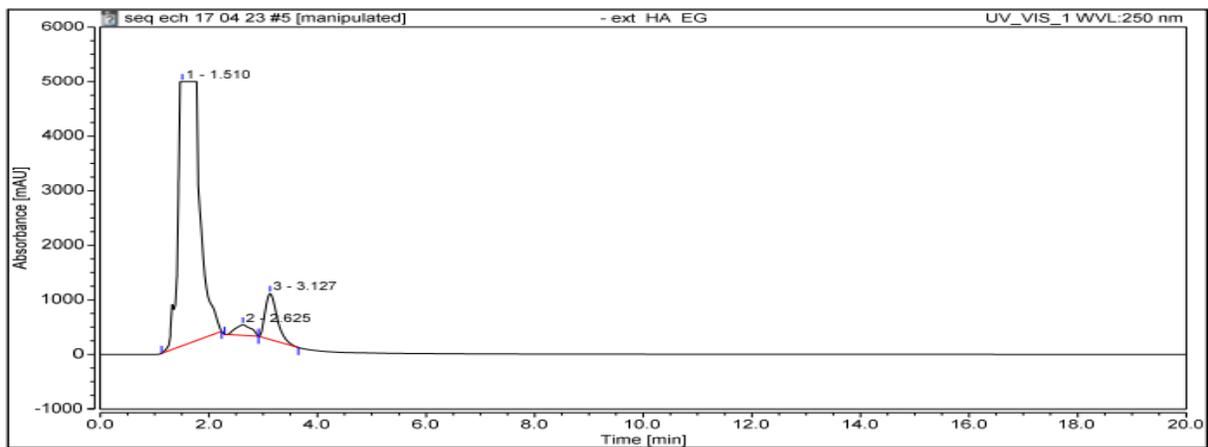
Figure IV.7 : Chromatogrammes de HPLC des différents extraits des écorces de Punica Granatum.



Extrait brut



Extrait DCM



Extrait HA



IV.4. La micro-encapsulation

Les trois facteurs à étudier prennent chacun deux niveaux. Le plus simple est de choisir un plan factoriel complet 2^3 (soit 8 essais et 2 essais centrés). Ce plan peut être représenté sous forme géométrique ou sous forme matricielle.

IV.4.1. Réalisation des essais et analyse statistique

Les microparticules ont été préparées par le procédé de double émulsion (E/H/E) à température ambiante, selon le même mode opératoire décrit précédemment. Donc, il s'agit de dix expériences dans un plan factoriel dont la matrice est représentée par le **tableau IV. 5**, comprenant 3 facteurs, X1= dose (Acide gallique + Acide ellagique), X2= Rp (rapport massique m_{Dex}/m_{PEG}), et 2 réponses, Y1= EEP% et Y2=EEF%, qui sont respectivement les taux en polyphénols et en flavonoïdes totaux.

Tableau IV.5: Plan factoriel à 2 niveaux, 3 facteurs -2 réponses et taux d'encapsulation en polyphénols et en flavonoïdes des microparticules obtenues par double émulsion E/H/E.

N° Essai	X1	X2	X3	EEP%	EEF%
1	-1	-1	-1	99.43	59.42
2	1	-1	-1	99.55	78.28
3	-1	1	-1	98.83	61.03
4	1	1	-1	99.69	62.68
5	-1	-1	1	99.05	39.77
6	1	-1	1	98.89	62.90
7	-1	1	1	98.49	26.40
8	1	1	1	99.58	44.43
9	0	0	0	99.26	68.62
10	0	0	0	99.88	64.87

L'évaluation statistique des données et la représentation graphique des résultats ont été réalisées par le logiciel MINITAB version 2017.



- **Utilisation du logiciel**

Les logiciels de plan d'expérience possèdent des bibliothèques de plan classiques et ils permettent aussi de construire les plans particuliers [149]. Le logiciel choisi dans cette étude est le Minitab. Il est programmé pour calculer les réponses dans tous les domaines d'étude, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer les courbes d'iso-réponses, pour construire les surfaces de réponse et pour déterminer les zones d'intérêt.

Pour réaliser un plan d'expériences à l'aide du logiciel Minitab, il faut définir les réponses, les facteurs et leurs niveaux, les modalités d'introduction de ces données sont pratiquement les mêmes pour tous les plans.

Le modèle mathématique postulé est un modèle du second degré et degrés 2 d'interactions par rapport à chaque facteur : $Y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_{12} x_1 x_2 + a_{13} x_1 x_3 + a_{23} x_2 x_3 + e$

Avec :

Y : est le vecteur de réponse.

a_0 : est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude.

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

e : est le vecteur de l'écart.

a_i ($i=1, 2, 3$) représente le coefficient des facteurs X ($i=1, 2, 3$).

a_{ij} ($i,j=1, 2, 3$) représente l'effet du changement d'un facteur du niveau bas vers le niveau haut.

L'interaction $X_i X_j$, représente l'effet de deux facteurs en même temps sur la réponse.

Dans ce cas, les réponses Y_i correspondant aux : taux des polyphénols (EEP%) et taux de flavonoïdes (EEF%) encapsulés, en fonction des facteurs étudiés sont données par les équations suivantes ((1) ; (2)).

IV.4.1.1. Taux d'encapsulation en polyphénols EEP%

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

L'analyse statistique permet d'évaluer les écarts de la valeur de la réponse donnée par le modèle, par rapport à la valeur expérimentale pour chaque terme de l'équation du modèle ainsi que



son ajustement. Elle donne l'estimation de la probabilité p-value à un intervalle de confiance de 95%, que la valeur prédite ne s'écarte pas plus de 5% de la valeur expérimentale. Les erreurs et l'ajustement des valeurs sont soumis aux tests de Student (t) (écart de la droite de la valeur prédite en fonction de la valeur expérimentale par rapport à l'origine) et de Fischer F (écart du modèle par rapport à la linéarité, écart de la valeur ajustée par rapport à la valeur moyenne). Les paramètres du contrôle statistique ainsi que leurs valeurs sont présentés dans le **tableau IV.6**. L'équation du modèle linéarisé qui prédit le mieux la réponse EEP% en variables codées est :

- **Equation de régression en variables codées**

$$\text{EEP} (\%) = 99,189 + 0,239 X_1 - 0,041 X_2 - 0,186 X_3 + 0,249 X_1 * X_2 - 0,006 X_1 * X_3 + 0,074 X_2 * X_3 + 0,381 \text{ Ct Pt} \dots\dots\dots(1)$$

Tableau IV.6 : Analyse statistique de la variance pour la réponse EEP%.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modèle	7	1,51854	0,216934	1,93	0,383
Linéarité	3	0,74714	0,249046	2,22	0,326
X1	1	0,45601	0,456012	4,06	0,182
X2	1	0,01361	0,013613	0,12	0,761
X3	1	0,27751	0,277512	2,47	0,257
Termes interaction	3	0,53884	0,179613	1,60	0,407
X1*X2	1	0,49501	0,495013	4,41	0,171
X1*X3	1	0,00031	0,000312	0,00	0,963
X2*X3	1	0,04351	0,043513	0,39	0,597
Erreur	2	0,22471	0,112356		
Manque d'ajustement	1	0,03251	0,032512	0,17	0,752
Total	9	1,74325			
Validation du Modèle	R² (%) = 87,11			R²ajusté (%) = 41,99	

Le modèle, la linéarité ainsi que les termes ne sont pas statistiquement significatives, puisque leur p-value sont supérieurs à la probabilité $\alpha=0.05$, correspondant à l'intervalle de confiance de 95%. De plus, les coefficients de régression linéaire $R^2 = 87.11\%$ est inférieur au seuil

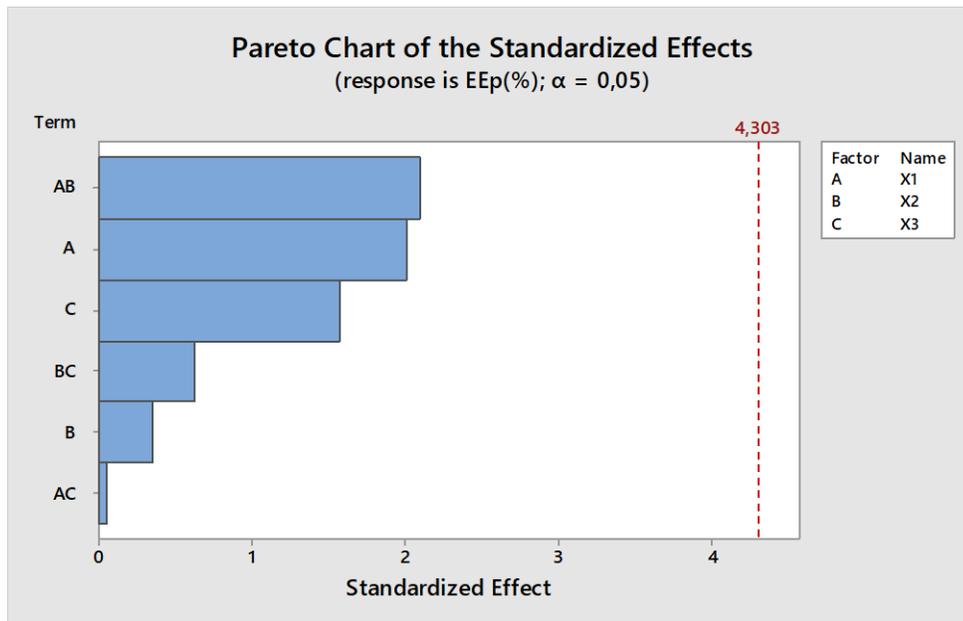


minimal d'acceptation qui est de 98%, ainsi que le coefficient d'ajustement qui est faible d'environ 41.99% seulement, ne permettent pas de valider l'équation du modèle, qui ne permet pas de prédire la valeur de la réponse EEP%.

b. Diagramme de Pareto pour EEP%

L'analyse de graphe de Pareto (**Figure IV.8**) nous permet d'évaluer les effets principaux des paramètres ainsi que ceux de leurs interactions sur la réponse étudiée. C'est l'un des moyens simples pour classer les paramètres par ordre d'importance. Le graphe de Pareto correspondant montre qu'aucun des termes n'est significatif, les barres correspondant à chacun des termes de l'équation sont au-dessous de la ligne limite de 4.303.

Figure IV.8: Diagramme de Pareto des effets des termes sur EEP%.



Sur ce diagramme, nous pouvons aussi observer les termes qui ont les effets les plus importants sur la réponse (EEP%). Dans ce cas, le terme d'interaction "AB" (X_1, X_2 =dose.Rp) et "A" (X_1 =dose) semblent être des facteurs plus influents, suivis de près par le facteur "C" (X_3 =pH) et d'interaction "BC" (X_2, X_3 =Rp.pH). Les autres termes "B" (X_2 =Rp) et d'interaction "AC" (X_1, X_3 =dose.pH) ont des effets plus faibles sur la réponse.

Les colonnes qui dépassent le trait en pointillé sont considérées comme étant statistiquement significatives et permettent de prédire la réponse. $X_1, X_1.X_3$ et $X_2.X_3$ influencent

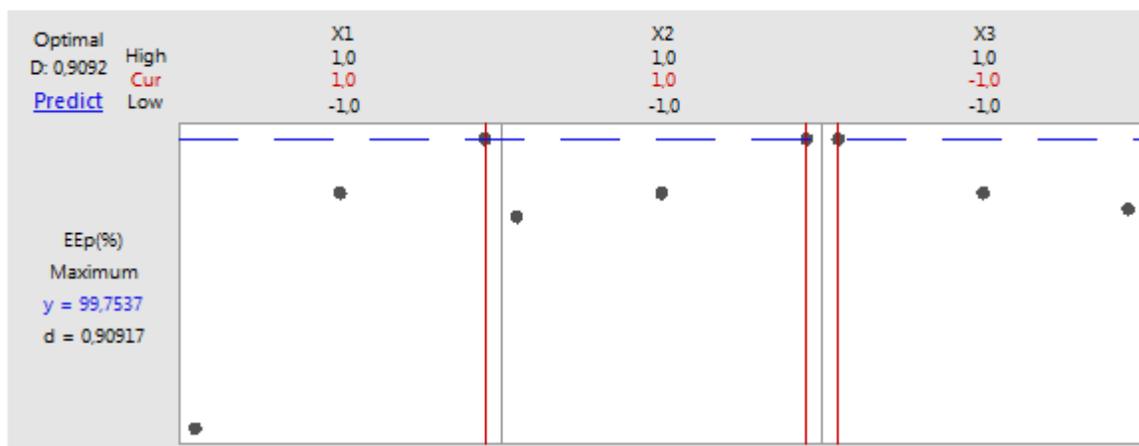


synergiquement (positivement) les valeurs du taux d'encapsulation EEP, tandis que X_2 , X_3 et $X_1.X_3$ influencent négativement sur les valeurs de la réponse.

c. Optimisation de la réponse EEP%

Cette partie a pour but de déterminer analytiquement les valeurs optimales des paramètres opératoires, ayant une influence sur le taux d'encapsulation des polyphénols (EEP%) de l'extrait brut des écorces de grenade. Le graphe d'optimisation est représenté sur la **Figure IV.9**.

Figure IV.9 : Diagramme d'optimisation de la réponse pour EEP %.



Ce test permet de donner les niveaux des facteurs qui optimisent la réponse EEP %. Pour atteindre le meilleur taux d'encapsulation en polyphénols EEP%= 99,7537%, on doit fixer les conditions suivantes :

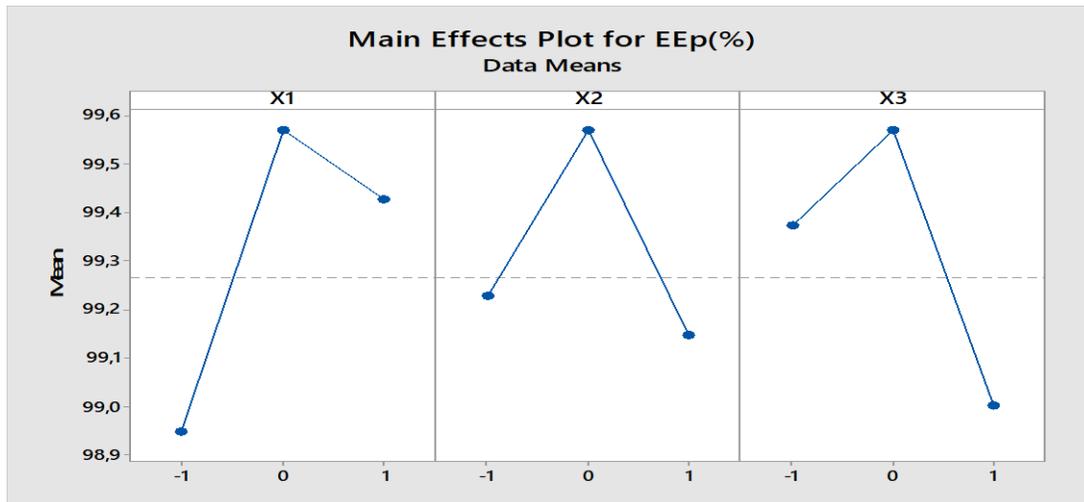
- La dose au niveau +1 : D= 172.8mg (dose maximale).
- Le RP au niveau +1 : RP= 6 ($m_{Dex} = 300\text{mg}$; $m_{PEG} = 50\text{mg}$).
- Le pH au niveau -1 : pH= 4 (acide).

d. Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEP%

Le diagramme des effets des principaux facteurs (**Figure IV.10**) nous renseigne sur l'influence simultanée de tous les facteurs sur le taux d'encapsulation en polyphénols (EEP%) :



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



D'après la **figure IV.10** on remarque que :

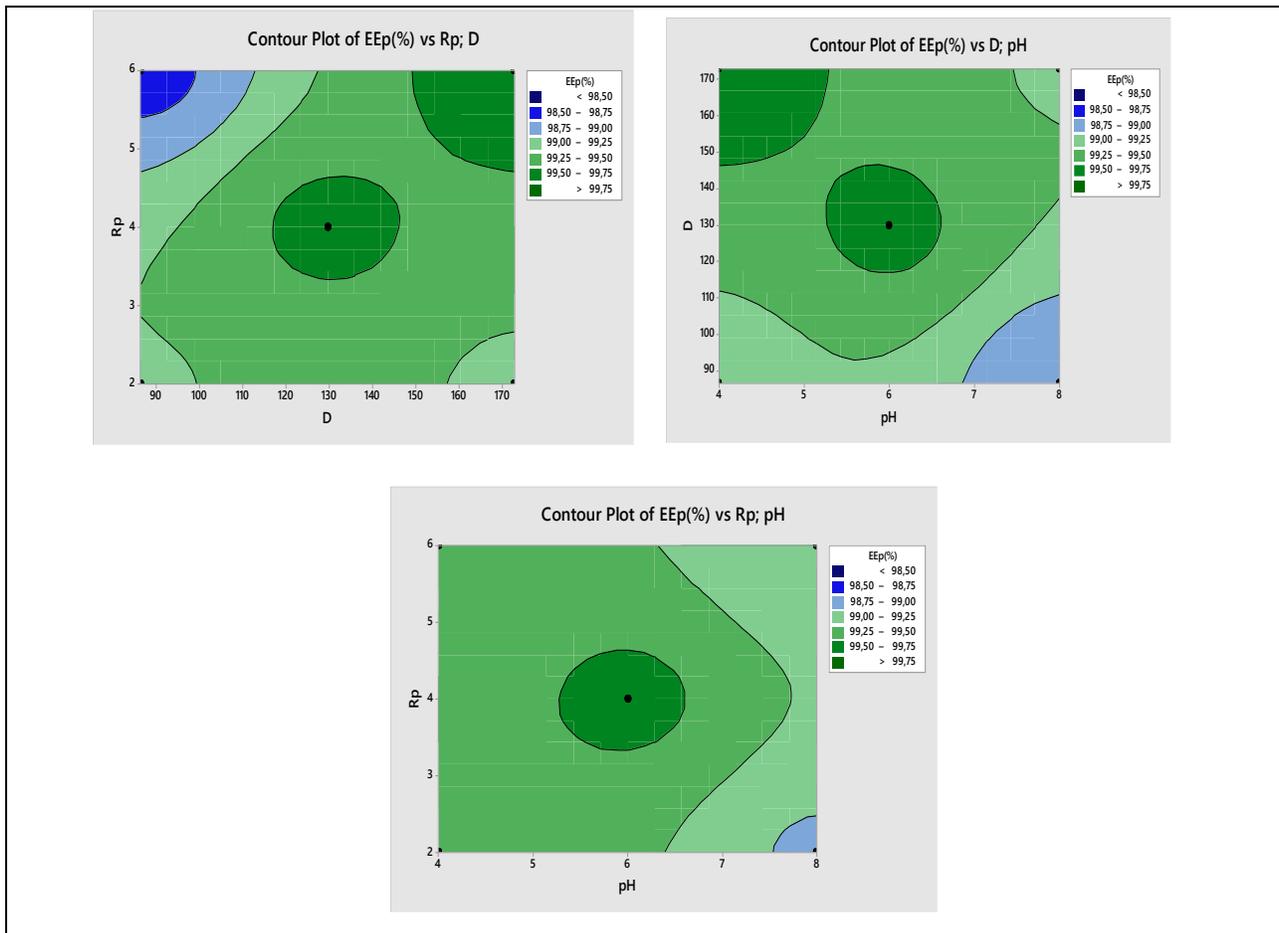
- ✓ Le taux en polyphénols encapsulés est minimal au niveau -1 correspondant à la dose minimale de 86.4mg. Plus la dose s'approche de la valeur moyenne de 129.6mg au niveau 0, plus le taux d'encapsulation en polyphénols est meilleur jusqu'à ce qu'il soit maximal. Puis il diminue un peu jusqu'à la dose maximale D=172.8mg.
- ✓ Le taux d'encapsulation augmente en augmentant le RP en partant de 2 au niveau -1 jusqu'à 4 au niveau 0, puis il diminue sensiblement à la valeur maximale de RP au niveau+1.
- ✓ Le taux d'encapsulation en polyphénols augmente du pH minimal= 4 (-1) au pH moyen=6 (0). Puis il décroît sensiblement jusqu'à la valeur maximale de pH=8 (+1).
On conclut donc, que les valeurs moyennes des facteurs correspondant au point central (000) sont les conditions idéales pour réaliser le meilleur taux d'encapsulation des polyphénols (EEP%).

e. Les diagrammes surface-réponse ou contours pour EEP%

La **figure IV.11** représente les graphiques de contours qui illustrent l'évolution de la réponse (Taux d'encapsulation en polyphénols EEP%) en fonction des niveaux des facteurs.



Figure IV.11 : Diagrammes Surfaces –Réponses ou contours pour EEP%.



- ✓ Le 1^e contour représente les domaines de la réponse EEP%, par rapport aux deux facteurs Rp et D. On observe deux domaines pour les taux d'encapsulation en polyphénols les plus élevés, l'un autour du point central (000) pour des doses pour un intervalle de D compris entre [115 ;145] et des Rp proches des valeurs moyennes [3.5 ;5.5], et un 2^e domaine situé vers les valeurs maximales de la dose [150 ;170] ainsi que de Rp, qui tend vers des valeurs supérieures à la moyenne, comprises dans le domaine [5.5 ;6].
- ✓ Pour la combinaison des facteurs pH et D dans le 2^e contour surface-réponse, il apparaît également deux régions dans lesquelles le taux d'encapsulation de EEP est le plus élevé (supérieur à 99.75 %). L'un est situé autour du point central, correspondant à un domaine tel que les valeurs des facteurs dose [115 ; 140] et pH [5 ; 6] tendent vers les moyennes des deux facteurs (129.6 mg et 6). Un second domaine correspond à des valeurs doses maximales [145 ;172.8] et des valeurs de pH minimales [4 ; 5] qui tendent vers le pH = 4 (acide).



- ✓ Le diagramme de contour des deux facteurs D et pH. Les deux facteurs nous renseignent sur l'évolution de la réponse. Pour la combinaison des facteurs D et pH, il apparaît une région vert foncé dans laquelle le taux d'élimination de EEP est plus important, ce qui indique que le taux d'encapsulation de ce dernier est plus de 99.75%, et un pH.
- ✓ Le diagramme de contour des deux facteurs Rp et le pH. Les deux facteurs nous renseignent sur l'évolution de la réponse dans laquelle le taux d'élimination de EEP qui est représentée par une région verte très foncée de plus de 99.75 % pour Rp [3.5] ; [4.5] et un pH acide du milieu jusqu'à un pH neutre.

IV.4.1.2. Taux d'encapsulation en flavonoïdes EEF%

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

Les paramètres du contrôle statistique ainsi que leurs valeurs sont présentés dans le **tableau IV.7**. L'équation du modèle linéarisé qui prédit le mieux la réponse EEF% en variables codées est :

- **Equation de régression en variables codées**

$$\text{EEF (\%)} = 54,36 + 7,71 X1 - 5,73 X2 - 10,99 X3 - 2,79 X1.X2 + 2,58 X1.X3 - 2,23 X2.X3 + 12,38 Ct Pt \dots\dots (2)$$

Tableau IV.7 : Analyse statistique de la variance pour la réponse EEF%.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modèle	7	2104,59	300,655	23,71	0,041
Linéarité	3	1703,97	567,989	44,79	0,022
X1	1	475,40	475,399	37,49	0,026
X2	1	262,55	262,549	20,70	0,045
X3	1	966,02	966,021	76,18	0,013
Termes d'interaction	3	155,35	51,783	4,08	0,203
X1*X2	1	62,22	62,217	4,91	0,157
X1*X3	1	53,30	53,303	4,20	0,177
X2*X3	1	39,83	39,828	3,14	0,218
Erreur	2	25,36	12,681		
Manque d'ajustement	1	18,33	18,332	2,61	0,353
Total	9	2129,95			
Validation du Modèle		R² (%) = 98,81		R²_{ajusté} (%) = 94,64	



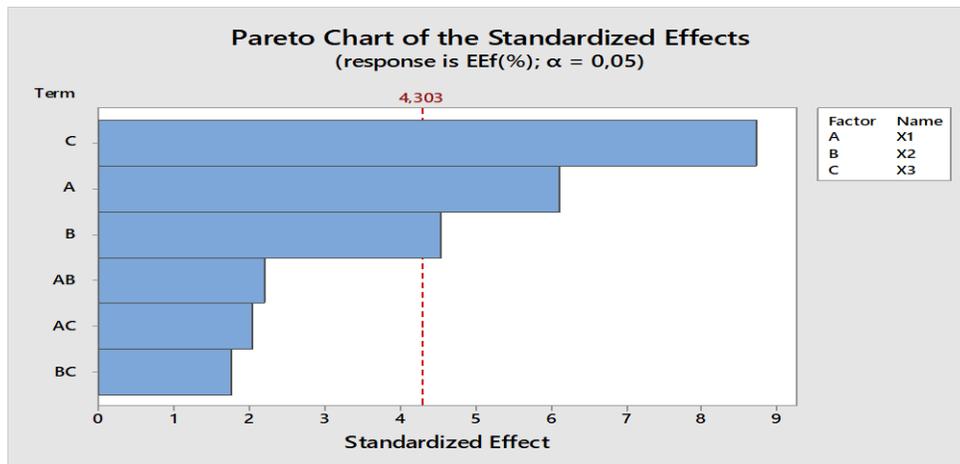
Le modèle, la linéarité ainsi que les termes du premier degré sont statistiquement significatives, puisque leur p-value sont inférieures à la probabilité $\alpha=0.05$, correspondant à l'intervalle de confiance de 95%. C'est le facteur pH (X_3) qui est le plus significatif (p-value=0.013), avec un coefficient de Fischer le plus élevé de l'ordre 76.18. De plus, les coefficients de régression linéaire $R^2 = 98.81\%$ est supérieur au seuil minimal d'acceptation qui est de 98%, ainsi que le coefficient d'ajustement qui est bon d'environ 94.64%, permettent de valider l'équation du modèle, qui prédit la valeur de la réponse et explique donc les valeurs obtenues pour la réponse EEF%. Les termes d'interaction $X_1 X_2$, $X_1 X_2$ et $X_1 X_3$ expliquent moins le modèle, et ne sont pas significatifs puisque leurs p-value sont supérieures à 0.05.

b. Diagramme de Pareto pour EEF%

Sur le diagramme de Pareto (**Figure IV.12**), nous pouvons observer les facteurs qui ont les effets les plus importants sur la réponse EEF%. Parmi tous les facteurs étudiés et au niveau de confiance choisi ($\alpha = 0,05$), les facteurs "C" (pH) et "A" (Dose) dont les barres dépassent la ligne de traversée (4.303) apparaissent comme des facteurs très influents et les plus significatifs, "B" (Rp) peut d'après ce même diagramme avoir un effet significatif moins important sur la réponse.

Les barres correspondant aux termes d'interaction AB, AC et BC sont au-dessous de la ligne limite, et ne sont donc pas significatifs. D'après l'équation les termes $X_1=A$ (dose) et d'interaction $X_1.X_3$ influencent synergiquement (positivement) la réponse et font donc augmenter le taux EEF%, par contre les autres termes, $X_2=B$ (Rp), $X_3 = C$ (pH) et d'interaction $X_1.X_2$ et $X_2.X_3$ influencent négativement en faisant diminuer les valeurs du Taux d'encapsulation des flavonoïdes.

Figure IV.12 : Diagramme de Pareto des effets pour EEF %.

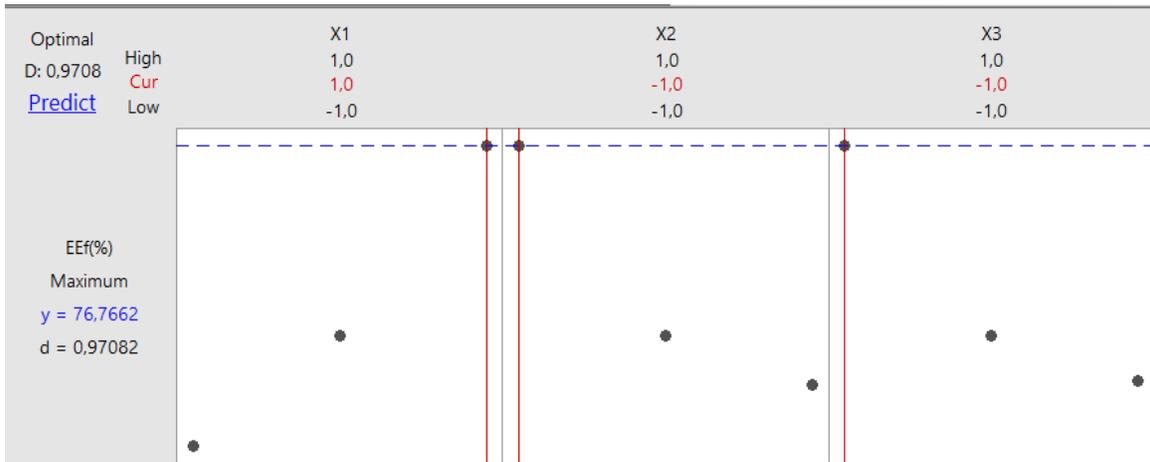




c. Optimisation de la réponse EEF%

Le graphe d'optimisation du taux d'encapsulation des flavonoïdes est représenté sur la **Figure IV.13**.

Figures IV.13 : Diagramme d'optimisation de la réponse pour EEF %.



Ce diagramme présente les niveaux des facteurs qui optimisent la réponse EEF %. Pour atteindre le meilleur taux d'encapsulation en polyphénols EEF%= 76,7662%, on doit fixer les conditions suivantes :

- La dose au niveau +1 : D= 172.8mg (dose maximale)
- Le RP au niveau -1 : RP= 2 ($m_{Dex} = 300\text{mg}$; $m_{PEG} = 150\text{mg}$)
- Le pH au niveau -1 : pH= 4 (acide).

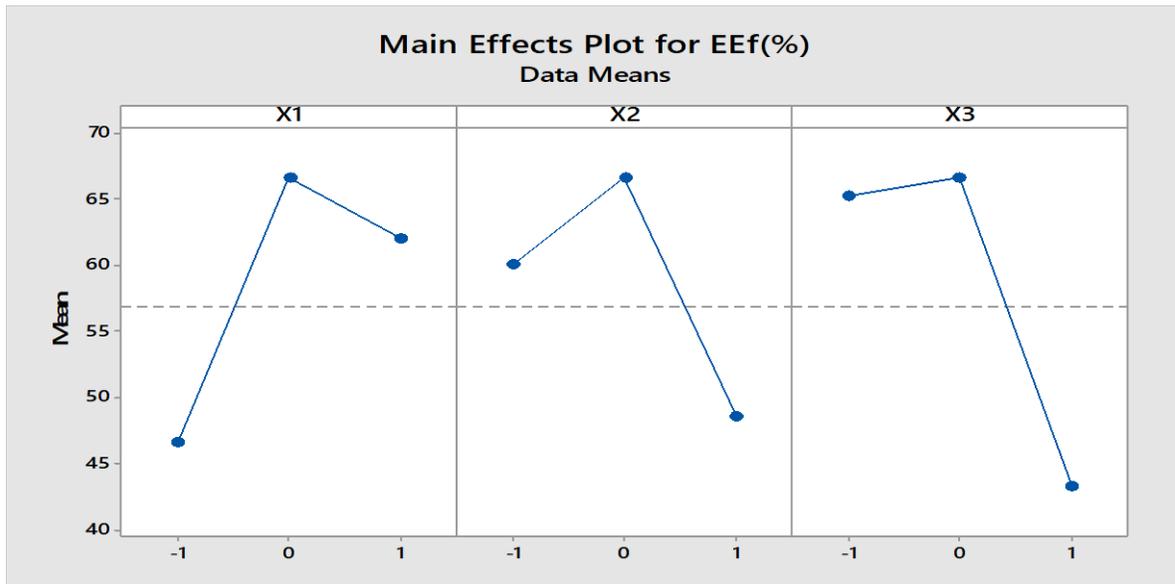
Le modèle prédit un meilleur taux d'encapsulation des flavonoïdes en fixant la dose de PAs à 172.8mg (maximale), le rapport massique des polymères minimal de 2 correspondant à une masse de PEG6000 de 150 mg la plus élevée égale à la moitié de la masse de dextrine et le pH à 4 (minimal) dans un milieu acide qui serait plus favorable à la micro-encapsulation.

d. Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEF%

Le diagramme des effets des principaux facteurs (**Figure IV.14**) nous renseigne sur l'influence simultanée de tous les facteurs sur le taux d'encapsulation des flavonoïdes (EEF%) :



Figure IV.14 : Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEF%.



D'après le diagramme, on remarque que :

- ✓ Le taux en flavonoïdes encapsulés est minimal au niveau -1 correspondant à la dose minimale de 86.4mg. Plus la dose s'approche de la valeur moyenne de 129.6mg au niveau 0, plus le taux d'encapsulation augmente jusqu'à ce qu'il soit maximal. Puis il décroît jusqu'à la dose maximale D=172.8mg.
- ✓ Le taux d'encapsulation varie dans le même sens avec RP, le meilleur taux EEF% est obtenu pour la valeur moyenne (0) de Rp= 4 (mDex= 300mg ; mPEG=75mg).
- ✓ Le sens de variation des taux d'encapsulation EEF% a été observé en fonction du pH, le meilleur taux a été obtenu pour le pH moyen = 6 (0).

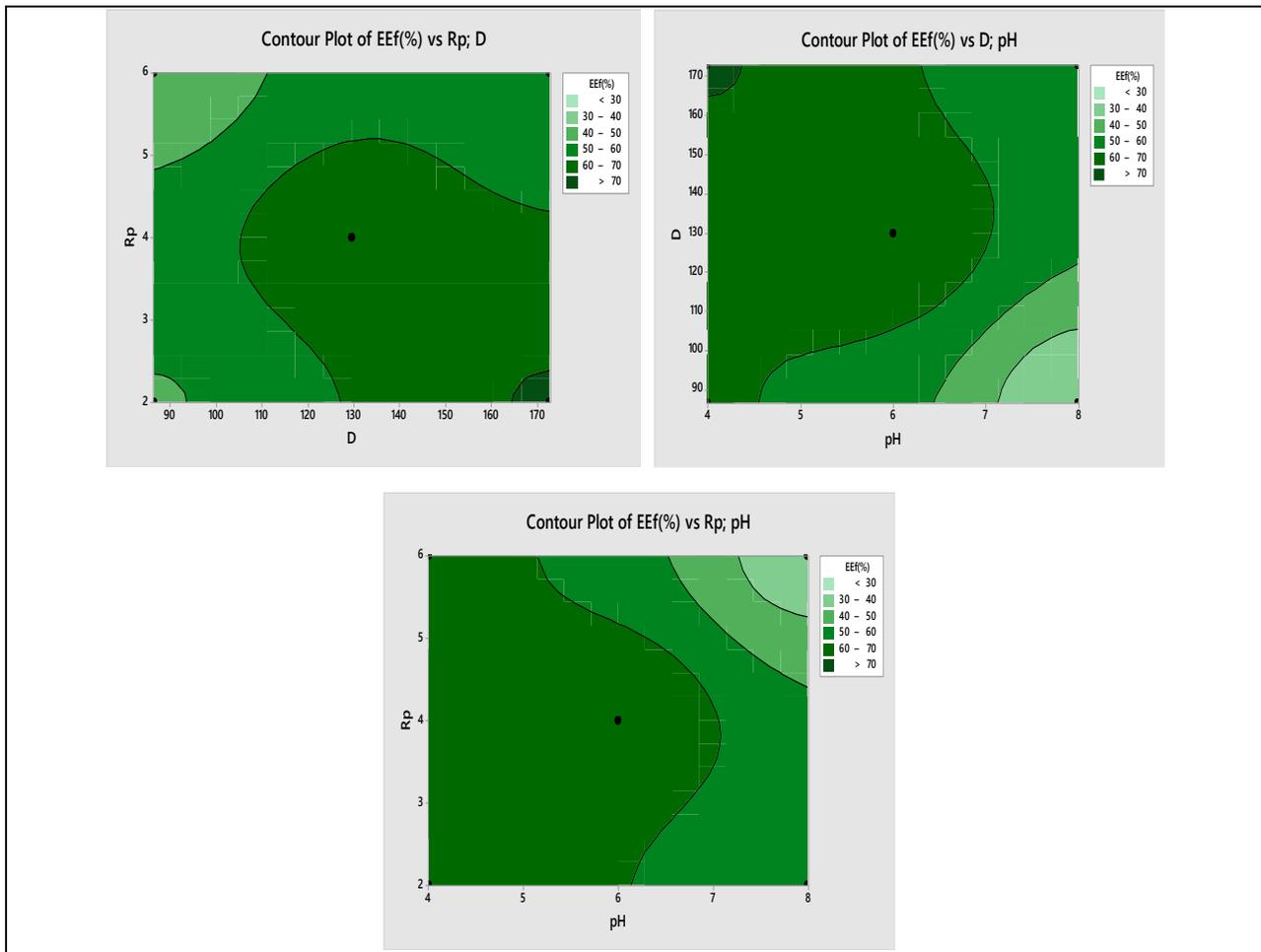
On conclut donc, que les valeurs moyennes des facteurs correspondant au point central (000) sont les conditions idéales pour réaliser le meilleur taux d'encapsulation des flavonoïdes.

e. Les diagrammes surface-réponse ou contours pour EEF%

La figure IV.15 représente les graphiques de contours qui illustrent l'évolution de la réponse EEF%) en fonction de deux facteurs à la fois.



Figure IV.15 : Diagrammes Surfaces –Réponses ou contours pour EEf%.



- ✓ Le 1^e contour représente les domaines de la réponse EEf%, par rapport aux deux facteurs Rp et D. On observe l'évolution de la réponse qui est représenté par une région comprise dans un intervalle de Rp entre [2 ; 2.4] et t D entre [165 ;170], correspondant aux taux les plus élevés supérieurs à 70%. Lorsque on diminue la dose aux valeurs minimales et en augmente le taux aux valeurs maximale [5 ; 6] ou contrairement on diminue Rp aux valeurs minimales du domaine [2 ; 2.2], on atteint les valeurs des taux les moins élevés <30%.
- ✓ Même effets pour l'influence combinée des deux facteurs, D et pH, sur la réponse EEf% dans le 2^e contour. On remarque que pour des domaines de variation de D maximales (172.8mg) et de pH minimales (4), les taux d'encapsulation dépassent 70%. Contrairement à ceci, lorsque le pH augmente à 8 (maximum) et la dose diminue à D=84.6mg (minimum), les taux EEf% diminuent et atteignent minimales < 30%.



- ✓ On n'observe pas le domaine correspondant aux taux les plus élevés (>70%) optimum pour la réponse EEF%, sous l'influence à la fois des deux facteurs, Rp et pH, comme le montre le 3^e contour surface-réponse. Plus la valeur de pH diminue à moins de 7, les taux d'encapsulation sont plus importants (60-70%), quel que soit la valeur de Rp [2-6]. Les valeurs de EEF% diminuent au fur et à mesure qu'on augmente le pH (8) et Rp (6) et atteignent des valeurs minimales (<30%).

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

La cinétique de libération des principes actifs (Polyphénols, Flavonoïdes) de l'extrait brut de Punica Granatum à partir des microcapsules de Dextrine / PEG, a été étudiée dans le milieu intestinal pH=6.8. On a fait l'étude sur la meilleure formulation, correspondant au meilleur taux d'encapsulation en polyphénols et en flavonoïdes optimisés par plan d'expérience.

IV.5.1. Profil de libération dans le milieu intestinal

Le **Tableau IV.8** représente le taux de libération des polyphénols, flavonoïdes et l'inhibition du radical DPPH dans le milieu intestinal en fonction du temps, de la meilleure formulation des microparticules de l'extrait brut des écorces de grenade.

Tableau IV.8: Taux de libération des polyphénols et flavonoïdes et l'inhibition de radical DPPH en fonction du temps des microparticules de l'extrait brut de Punica Granatum dans Dextrine / PEG dans le tampon à pH= 6.8.

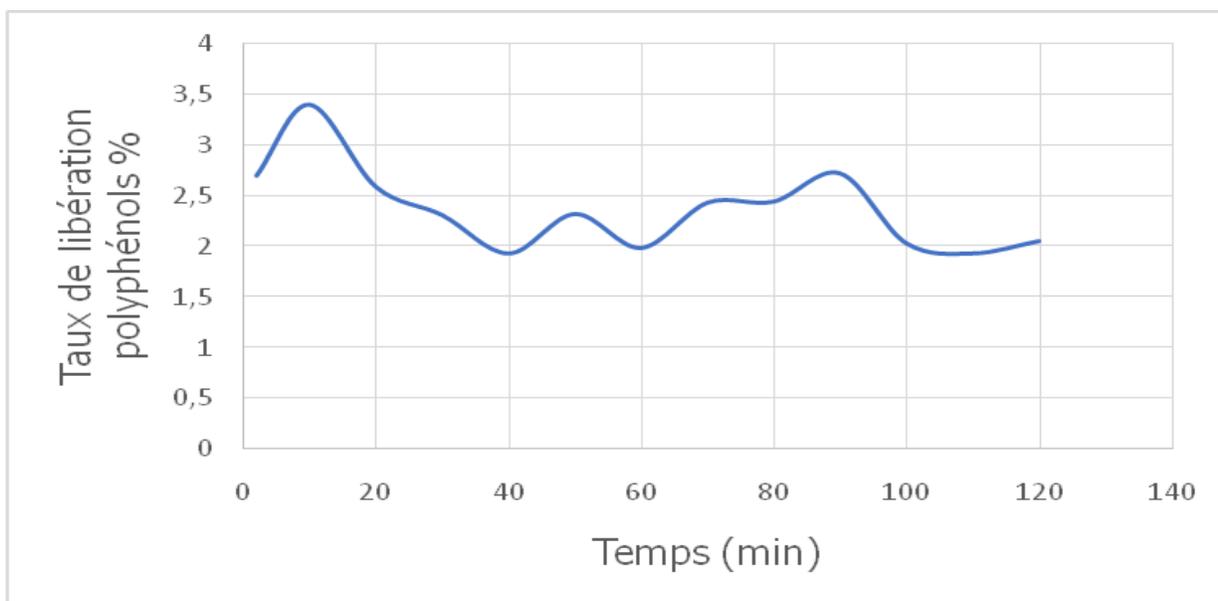
Temps (min)	Concentration des polyphénols (mg/ml)	Taux de libération des polyphénols%	Concentration des flavonoïdes (mg/ml)	Taux de libération des flavonoïdes%	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH%
2	2.697	2.035	0	0	7.26
10	3.4	2.565	0	0	5.28
20	2.586	1.951	0	0	0
30	2.307	1.471	0	0	0
40	1.928	1.454	0	0	0
50	2.318	1.749	0	0	0
60	1.983	1.496	0	0	0
70	2.430	1.833	0	0	0
80	2.441	1.842	0	0	0
90	2.720	2.052	0	0	3.79



100	2.028	1.530	0	0	0
110	1.928	1.454	0	0	0
120	2.05	1.547	0	0	8.41

La **figure IV.16** représente l'évolution du taux de polyphénols libérés en fonction du temps dans le tampon pH=6.8.

Figure IV.16 : Cinétique de la libération des polyphénols.



On observe une légère augmentation du taux en polyphénols dès les 10 premières min. Puis une diminution jusqu'à 40 min. Les valeurs deviennent plus ou moins constantes jusqu'à 120 mn. Néanmoins, on remarque que les taux en polyphénols libérés sont assez faibles et ne dépassent 2.565%. Ceci peut être expliqué que la libération est assez ralentie dans le milieu tampon pH=6.8 pendant 2 heures.

On n'observe pas la libération des flavonoïdes durant toute la cinétique de libération.

Pour augmenter les taux de libération des polyphénols et des flavonoïdes dans ce milieu physiologique à pH= 6.8, il faut prolonger le temps de libération pour plus de 2h et faire l'étude sur plusieurs jours.

• Commentaires

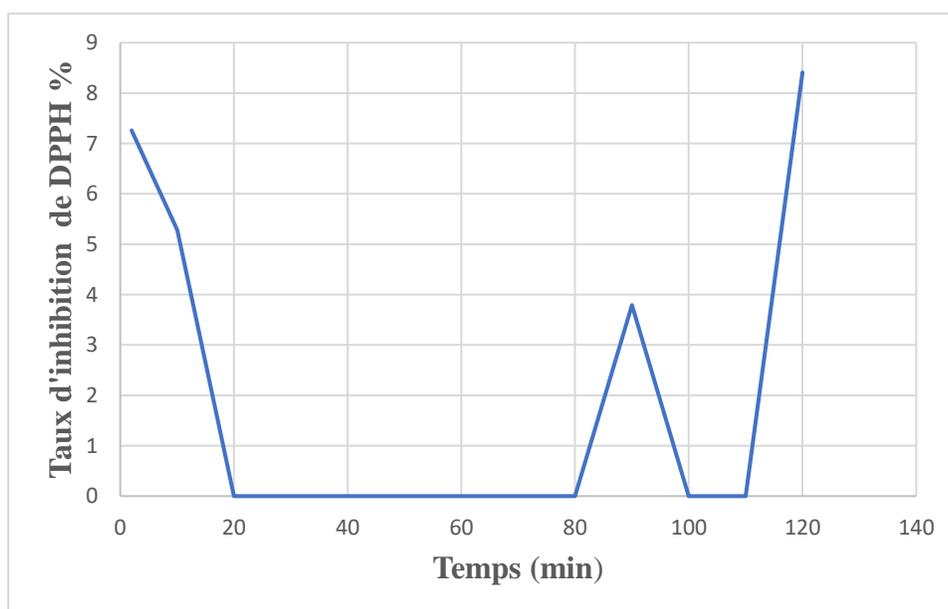
D'après la **figure IV.16**, le taux de libération des polyphénols au niveau intestinal peut être faible en raison de différents mécanismes de libération qui peuvent se produire pendant une période plus prolongée au-delà de 2 heures. Quelques types de libération pourraient expliquer cette observation :



- ✓ Libération lente : Certains polyphénols peuvent être encapsulés dans des matrices ou des complexes qui nécessitent un temps plus long pour se dissoudre libérer les composés actifs. Cette libération lente peut entraîner un taux de libération plus faible au cours des premières heures.
- ✓ Libération contrôlée : Certains polyphénols peuvent être libérés de manière contrôlée dans l'intestin, ce qui signifie qu'ils sont régulés par des mécanismes de diffusion ou d'autres processus de libération graduelle. Cette libération contrôlée peut entraîner un taux de libération plus prolongé au-delà de 2 heures.
- ✓ L'absence de flavonoïdes libérés dans le milieu intestinal peut être due à un mécanisme de libération à effet retard. Ce type de libération se caractérise par une libération plus lente et prolongée des composés actifs, pouvant s'étendre sur des heures ou mêmes des jours.

D'après la **figure IV.17**, les résultats ont révélé un pourcentage d'inhibition très faible au début de l'expérience pour le radical libre DPPH (7,26% à 2 minutes). Par la suite, le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH diminue à 0% pendant certaines périodes, ce qui signifie qu'il n'existe aucune activité anti-oxydante due à un faible taux de polyphénols libérés et à l'absence de flavonoïdes. Cependant, au fil du temps, le pourcentage d'inhibition augmente progressivement pour atteindre finalement 8,41% à 120 minutes.

Figure IV.17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH% en fonction du temps.

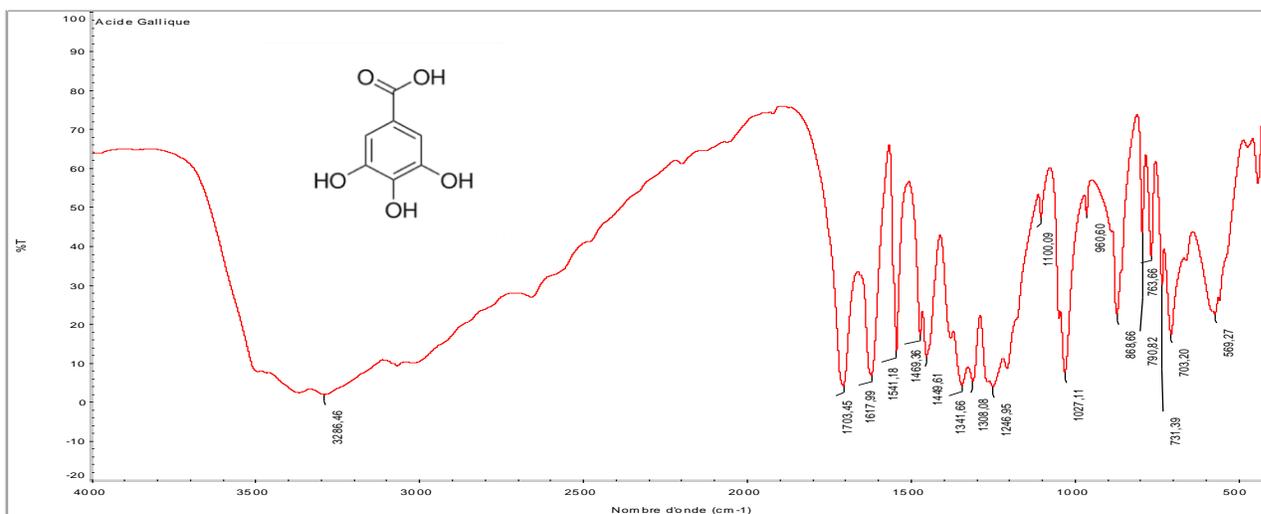




IV. 6. Caractérisation par IRFT

Les spectres IR de la poudre, de l'extrait des écorces de grenade (*Punica Granatum*), du résidu de macération et des microparticules de l'extrait (**Figures IV.24, IV.25, IV.26, IV.27**) obtenus ont été enregistrés dans le domaine [4000-400 cm⁻¹]. L'analyse des spectres IR est faite par comparaison avec les spectres IR de références des standards, qui sont l'acide gallique, l'acide ellagique, la quercétine, le glutaraldéhyde, la Dextrine et le PEG6000 (**Figures IV.18, IV.19, IV.20, IV.21, IV.22, IV.23**), pour identifier les différents composants existants dans les extraits et dans les microparticules.

Figure IV. 18 : Spectre infrarouge IRFT de l'acide gallique dans le KBr.



FigureIV.19 : Spectre infrarouge IRFT de l'acide ellagique dans le KBr [173].

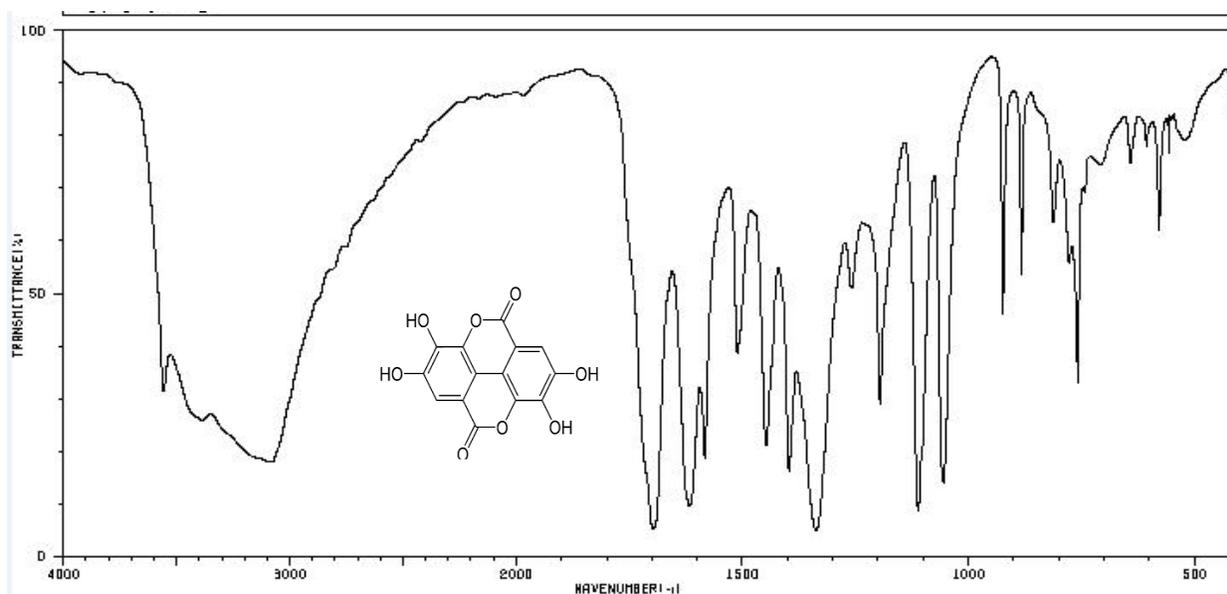




Figure IV. 20 : Spectre infrarouge IRFT de la quercétine dans le KBr.

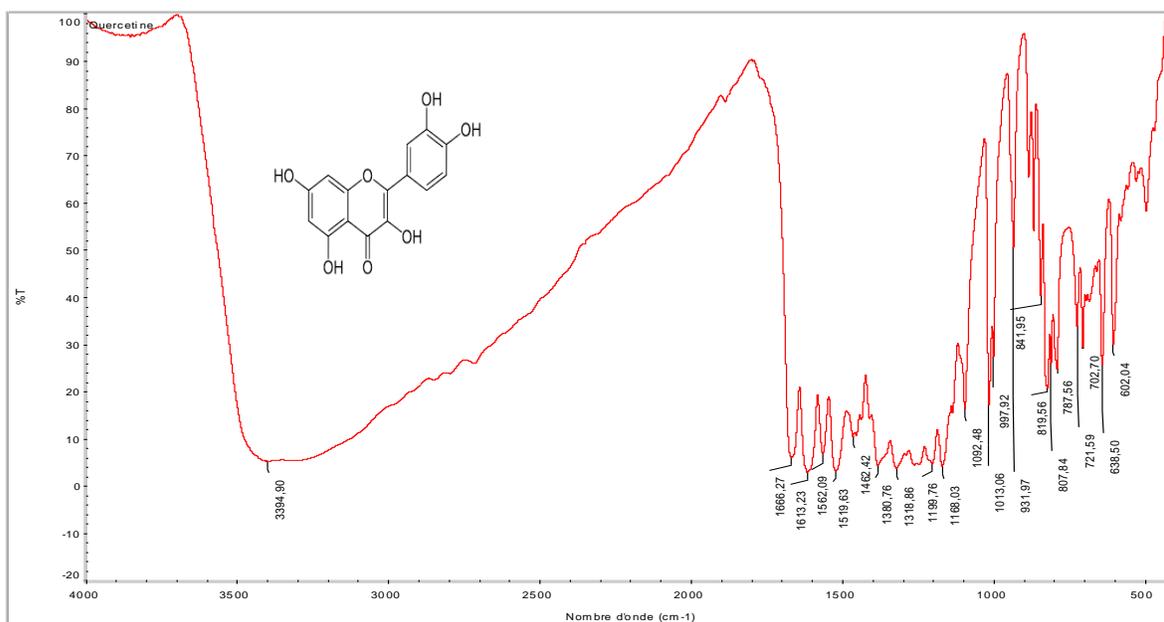


Figure IV.21: Spectre infrarouge IRFT du glutaraldéhyde dans le KBr

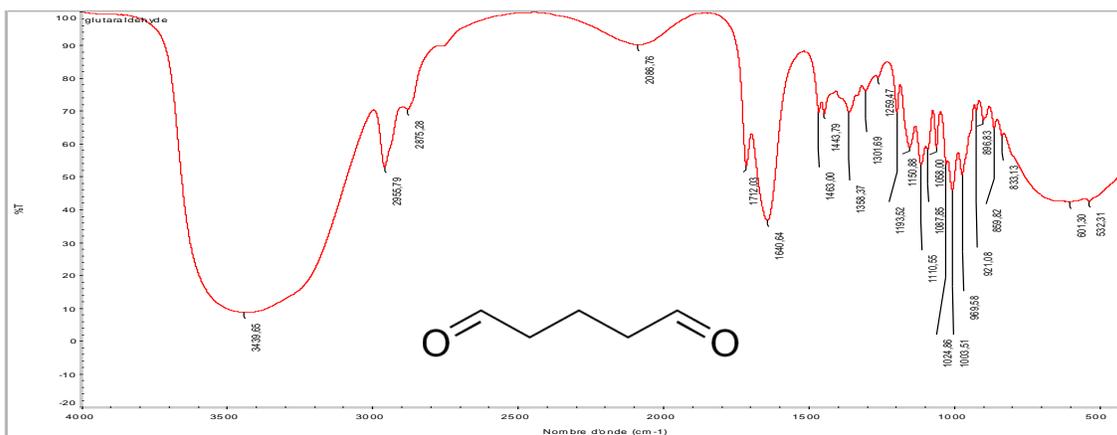


Figure IV.22 : Spectre infrarouge IRFT de dextrine dans le KBr.

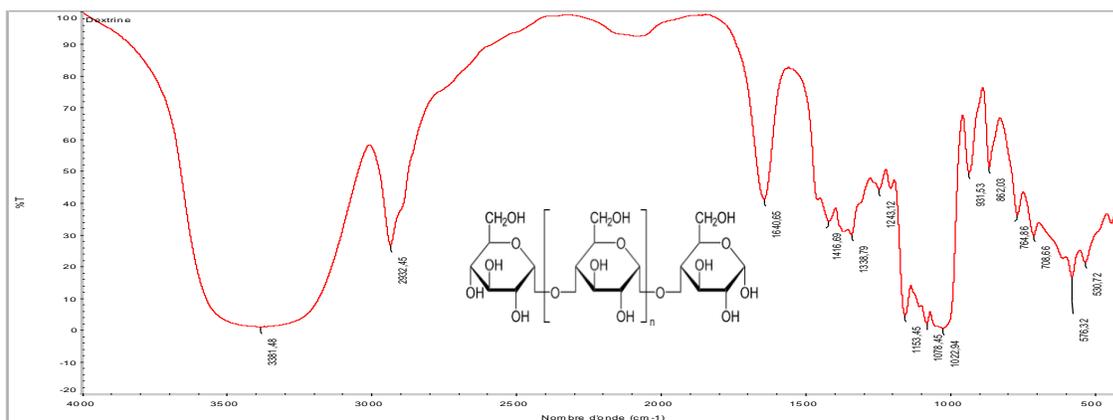




Figure IV.23 : Spectre infrarouge IRFT du PEG dans le KBr

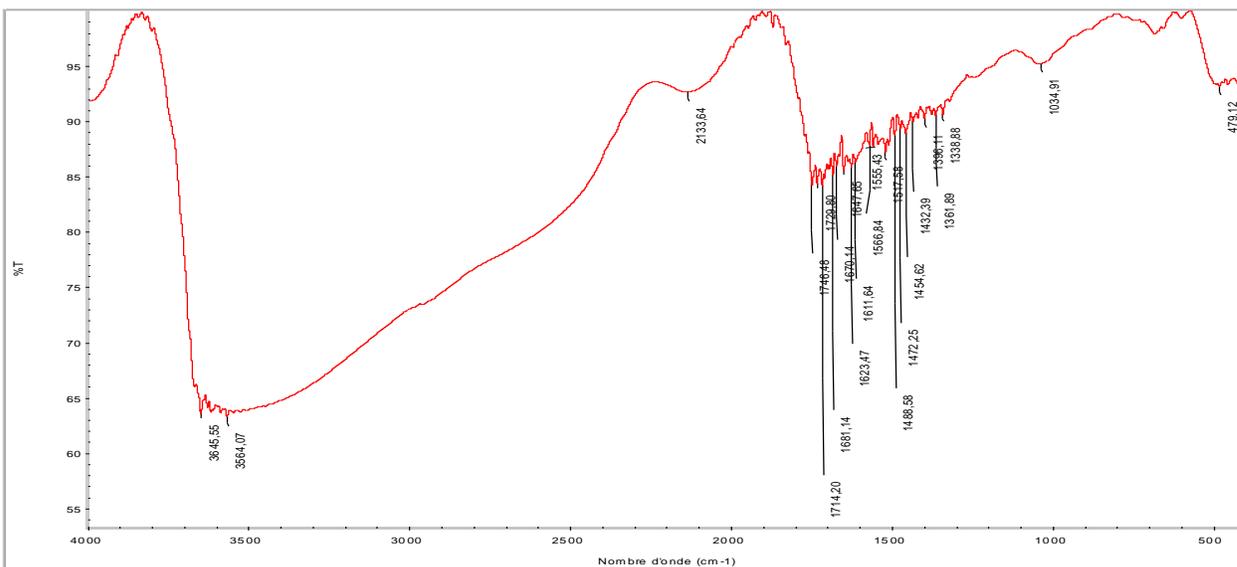


Figure IV.24: Spectre infrarouge IRFT de l'extrait EG après évaporation dans le KBr.

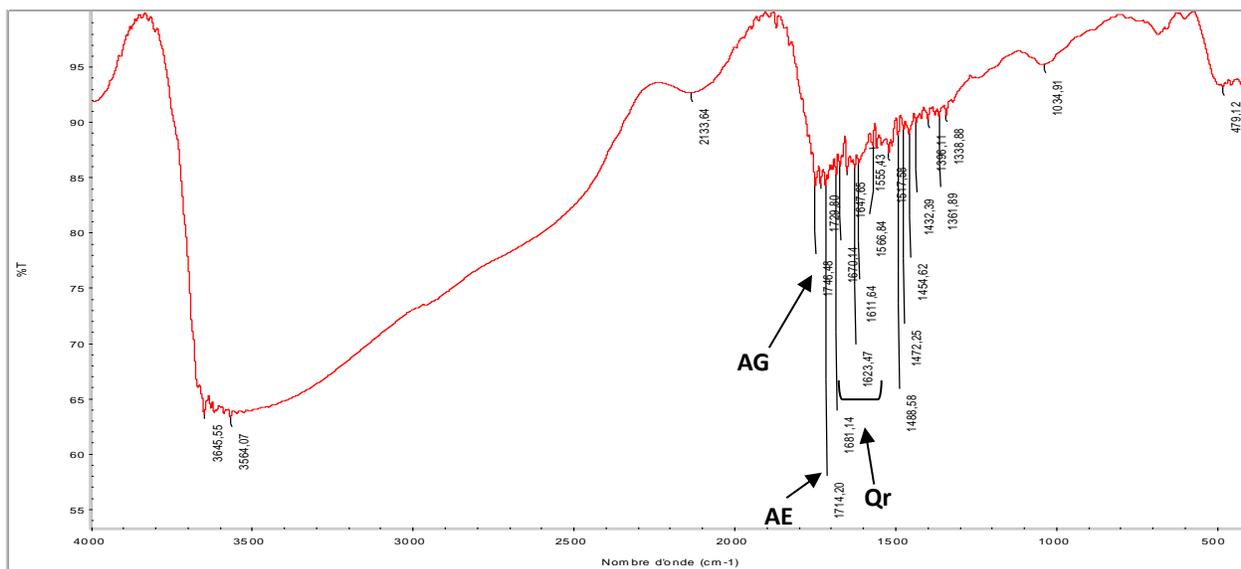




Figure IV.25 : Spectre infrarouge IRFT des microcapsules de l'extrait EG dans le KBr.

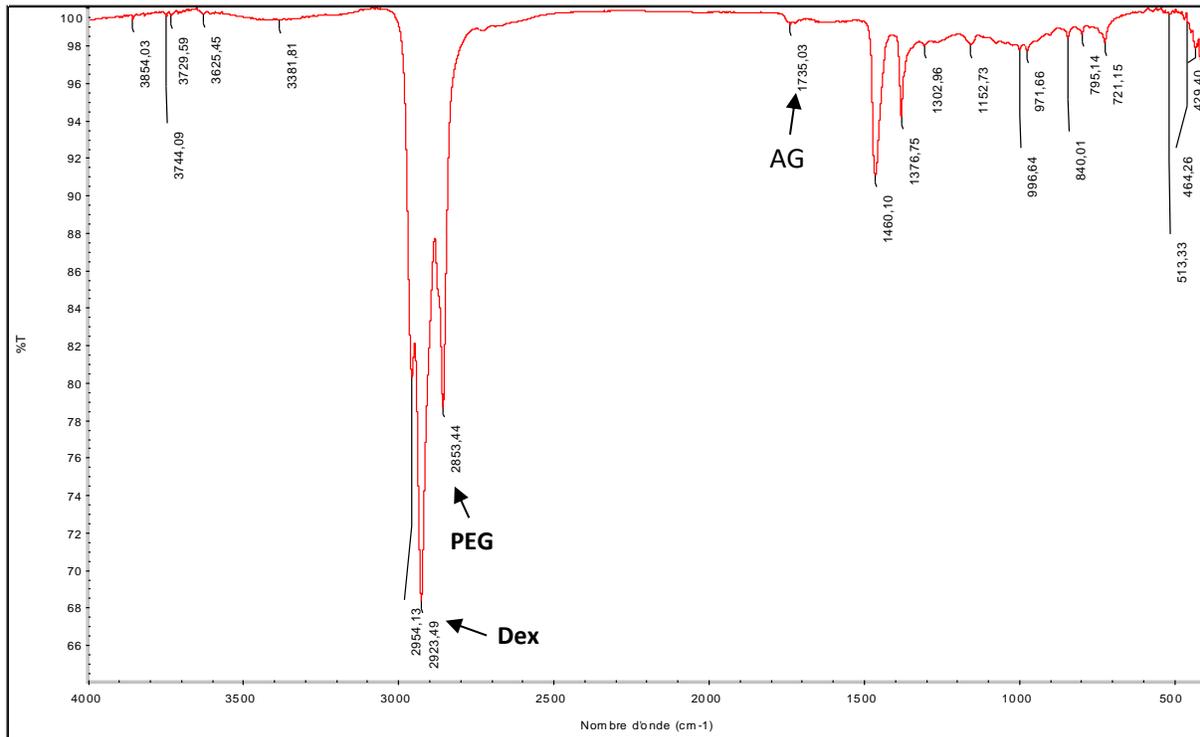


Figure IV. 26 : Spectre infrarouge IRFT de la poudre de EG Dans le KBr.

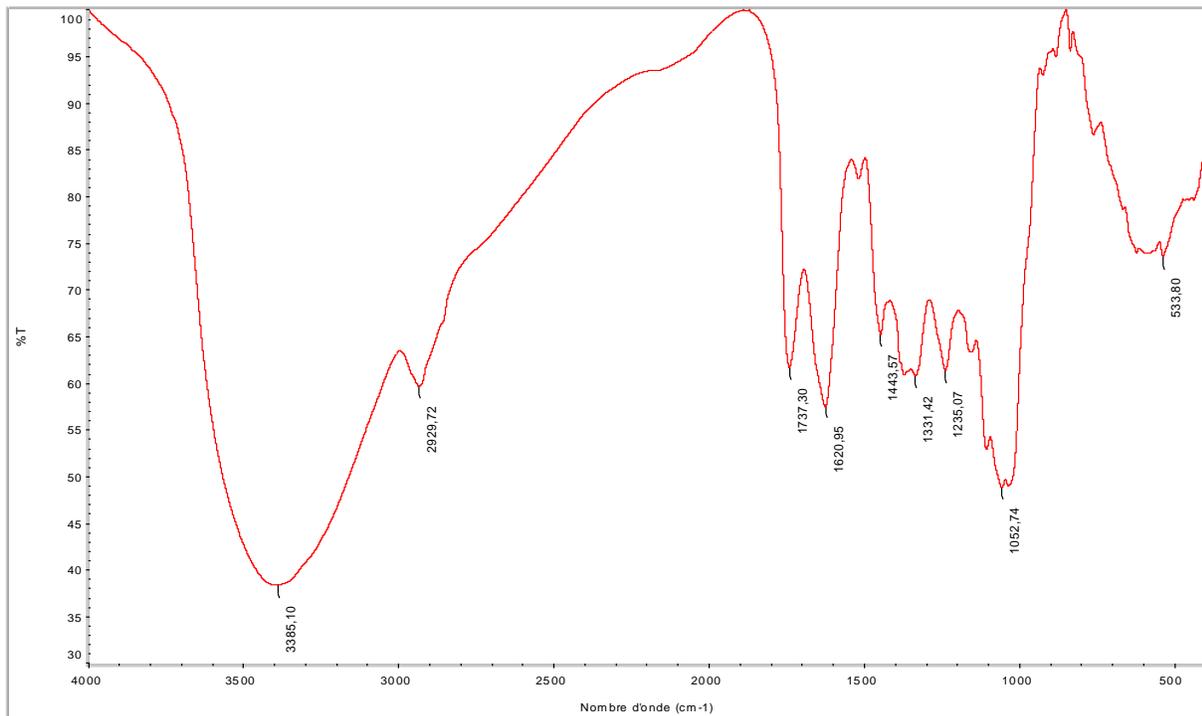
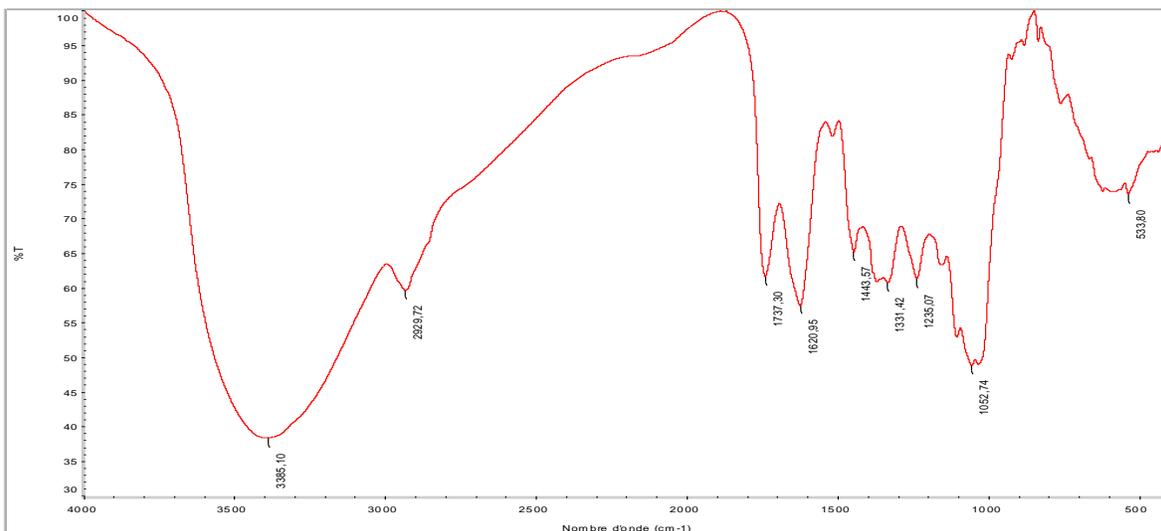




Figure IV. 27 : Spectre infrarouge IRFT du résidu de macération dans le KBr



Dans le **tableau IV.9**, nous avons résumé les principales bandes d'absorption IR qui caractérisent les liaisons chimiques des composés présents dans l'extrait et dans les microparticules, en le comparant à celles des standards.

D'après les résultats des analyses infrarouges, nous pouvons conclure que l'extrait est riche en polyphénols, tels que l'acide gallique et l'acide ellagique et en flavonoïdes comme la quercétine. Une bande caractéristique de l'acide gallique (AG) à environ 1735 cm^{-1} de faible intensité a été observée dans les microparticules de Dex/PEG. Ce qui montre que l'extrait de EG a été encapsulé.

Tableau IV.9 : Bandes d'absorption IR des liaisons chimiques caractéristiques de composés identifiés dans l'extrait brut des écorces de *Punica granatum*, des microcapsules de l'extrait par rapport aux références standards et des réactifs de micro-encapsulation.

Nombres d'onde (cm-1)	Types de liaisons ou groupement chimique	Echantillon	Composés
3200-3400 1700-1740 1620-1450 1350-100 950-600	OH (alcool) C=O (acide) C=C (aromatique) C-O (alcool) C-H (aromatique)	Acide gallique	Standard



3580-3600 3020-3400 1700-1740 1625-1680 1050-1450	OH(libre) OH(liées) C=O(ester) C=C(aromatique) C-O(ester)	Acide ellagique	standard
3600-3250 1650-1730 1620-1450 1400-1100 1000	OH (alcool) C=O (cétone) C=C (aromatique) C-O (des alcools) C-O-C (cycle)	Quercétine	Standard
3500-3250 2800-3000 1620-1450 1400-1100 1000 950-600	OH (alcool) C _{tét} -H C=C (aromatique) C-O (des alcools) C-O-C (cycle) C-H (aromatique)	Glutaraldéhyde	Standard
3500-3250 2800-3000 1650-1700 1400-1100 1000 950-600	OH (alcool) C _{tét} -H C=C (alcène) C-O (des alcools) C-O-C (cycle) C-H (aromatique)	Dextrine	Polymère
3500-3250 2810-3000 1620-1450 1400-1100 950-600	OH (alcool) C-H (alcane) C=C (aromatique) C-O (des alcools) C-H (aromatique)	PEG	Polymère
3500-3250	OH (alcool)	Acide gallique, acide ellagique	Extrait EG après évaporation
2000-2400	N=C (cycle Corine)	Amines	
1700-1740	C=O(ester)	Acide gallique,acide ellagique.	
1625-1650	C=C (alcène)	Ellagitannins et flavonoïdes	
1620-1400	C=C (aromatique)	Quercétine,	
1000	C-O-C (cycle)		
3700-3000	OH (très large)	Acides gallique,acide ellagique.	Micro-encapsulation de l'extrait EG
2950-2850	CH ₃ , CH ₂	Glutaraldéhyde, dextrine	
1700	C=O (acide)	/	
950-600	C-H (aromatique)	Glutaraldéhyde, Dextrine,PEG	
3500-3250	OH (alcool)	Acide gallique et acides ellagique	Poudre EG
1400-1100	C-O (des alcools)		
950-600	C-H (aromatique)		
1625-1680	C=C (alcène)	Ellagitannins et flavonoïdes	



3500-3250	OH (alcools)	Acide gallique,acide ellagique	Résidu de macération
2800-3000	C _{tét k} -H	/	
1700	C=O (acide)		
1400-1100	C-O (des alcools)	Quercétine	
1000	C-O-C (cycle)		

Conclusion et perspectives





Conclusion

Actuellement, l'utilisation des plantes médicinales dans l'industrie pharmaceutique suscite un vif intérêt dans la recherche biomédicale.

L'écorce de grenade est une source riche en polyphénols, qui sont connus pour leurs diverses activités biologiques et antioxydantes.

La poudre d'écorce de grenade est obtenue grâce à un processus de séchage naturel, ce qui lui confère une stabilité et facilite son extraction.

Dans notre étude, nous avons réussi à obtenir un rendement de 46.82%, en utilisant le procédé de macération pour l'extraction des principes actifs de l'écorce de grenade. Ensuite nous avons réalisé une extraction par différents solvants organiques tels que l'éther de pétrole (EP), le Dichlorométhane (DCM) et l'éthanol.

Les taux de polyphénols et de flavonoïdes dans nos extraits ont été mis en évidence grâce à des essais de caractérisation utilisant différentes techniques d'analyse, notamment l'analyse UV visible, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IFRT).

Grâce à ces techniques d'analyse, nous avons pu identifier trois composés spécifiques présents dans nos extraits d'écorce de grenade : l'acide gallique, l'acide ellagique et la quercétine dans l'extrait méthanolique de l'écorce qui présente la teneur la plus élevée en polyphénols.

L'activité antioxydante *in vitro* est évaluée en utilisant la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). L'extrait brut présente une capacité de neutralisation plus puissante envers le radical libre DPPH, car il contient une concentration significativement élevée du principe actif, l'acide ellagique. C'est pourquoi, nous avons choisi d'encapsuler l'extrait brut, afin de prendre en considération l'effet thérapeutique de l'acide ellagique. De plus, il est important de souligner que notre extrait brut présente également une concentration élevée en acide gallique. En revanche, les autres extraits (DCM, HA, EEP) présentent une activité antioxydante moins prononcée, car ils contiennent d'autres molécules telles que des flavonoïdes et des huiles essentielles, qui possèdent d'autres propriétés pouvant masquer cette activité.

Nous avons également axé notre recherche pour développer une nouvelle formulation d'extraits de *Punica Granatum* par micro-encapsulation pour la voie orale. Afin d'optimiser la



formulation des microparticules du principe actif d'extrait de l'écorce par double émulsion, une étude d'optimisation préliminaire a été réalisée, pour déterminer les meilleures conditions de micro-encapsulation, telles que la dose, le rapport massique des polymères et le pH. Ces paramètres clés jouent un rôle déterminant dans les caractéristiques des microparticules obtenues.

Le meilleur taux d'encapsulation dans la dextrine/PEG, pour les polyphénols et les flavonoïdes a été obtenu respectivement à hauteur de 99,69 % et 62,86 %, avec une dose maximale de 172,8 mg/ml, un rapport de polymère de 6 et un pH de 6 pour les polyphénols mais pour un Rp de 2 et un pH de 4 pour les flavonoïdes.

Les résultats de la modélisation ont montré l'existence d'interactions réelles entre les paramètres, qui influencent les valeurs moyennes des paramètres et permettent d'obtenir des réponses prédites relatives aux polyphénols (EEP%) et aux flavonoïdes (EEF%).

Pour valider l'utilisation des microparticules comme vecteur de la substance active, nous avons étudié leur cinétique de libération par dissolution à l'aide d'un dissolutest dans un milieu physiologique tampon avec un pH de 6,8.

Les profils cinétiques observés, montrent que la libération des polyphénols est très lente et pour les flavonoïdes elle présente un effet retard.

Nous avons également réussi à interpréter la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans notre extrait en identifiant certains principes actifs par spectroscopie infrarouge.



Perspectives

À la lumière de nos résultats, voici quelques perspectives intéressantes pour de futures recherches :

- ✓ Optimisation des conditions d'extraction : Utilisez des méthodes de conception expérimentale pour optimiser les paramètres d'extraction tels que le rapport solvant/matière végétale, la durée d'extraction, la température, etc. pour obtenir le meilleur rendement et la plus grande quantité de principes actifs.
- ✓ Micro-encapsulation : Explorez différentes méthodes de micro-encapsulation (comme la coacervation, l'extrusion, la gélification ionique, etc.) pour encapsuler les extraits de grenade. Évaluez les paramètres d'encapsulation, tels que la taille des particules, l'efficacité d'encapsulation et la stabilité des microcapsules formées.
- ✓ Combinaison de polymères : Étudiez l'effet de la combinaison de plusieurs polymères dans la formulation des microcapsules. Les mélanges de polymères peuvent améliorer les propriétés mécaniques, la stabilité et la libération des principes actifs. Explorez les interactions entre les polymères et leur influence sur les caractéristiques des microcapsules, telles que la morphologie, la taille des particules et les propriétés de libération.
- ✓ Étude de la stabilité des principes actifs : Évaluez la stabilité des principes actifs encapsulés pendant la période de libération. Analysez l'effet de la température, de l'humidité, du milieu physiologique, de l'exposition à la lumière, etc. sur la stabilité et la viabilité des principes actifs pendant la libération.
- ✓ Combiner des extraits d'écorce de grenade avec d'autres sources d'antioxydants : Étudiez les synergies potentielles entre les composés antioxydants de l'écorce de grenade et d'autres sources d'antioxydants naturels, tels que les extraits de fruits, les extraits de plantes ou les antioxydants synthétiques. Les combinaisons peuvent améliorer l'activité antioxydante globale en agissant de manière complémentaire ou synergique.
- ✓ Évaluation de l'activité biologique : Étudiez l'activité biologique des extraits et des microcapsules contenant les principes actifs de l'écorce de grenade. Réalisez des tests *in vitro* et *in vivo* pour évaluer leur efficacité dans le traitement de certaines pathologies ou leur potentiel en tant qu'antioxydants.

Références Bibliographiques





Références Bibliographiques

- [1] : GHNIMI W, 2015 : Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées : Ricinus communis et Jatropha curcas Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action sur l'activité cetylcholinestérase. Thèse de doctorat université de lorraine (France) et université de Carthage (Tunisie) P2.
- [2] : KADA S, 2018 : Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques. Thèse de doctorat Université Ferhat Abbas Sétif 1 P1.
- [3] : MOON, J.K., & SHIBAMOTO, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57: 1655–1666.µ
- [4] : BOUHEROUM, M (2007), Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes, Rhantherim adperssum et Ononis anfastissima. Thèse de doctorat de l'université de Constantine.
- [5]: BOH &KARDOS, D (2003), Microcapsule patent and product, 6, 47-83
- [6]: SALSAC A.V, (2017), Modelling and characterization of microcapsules. Biomechanics & Bioengineering Laboratory (UMR CNRS 7338), University de Technologies de Compiègne, France.
- [7] : MAOUCHE, N et BAZIZ, N, (2018). Effets des huiles essentielles et des extraits ethanologiques du thym sur les propriétés physicochimiques et biologiques du PLA.
- [8] : FOURNIER, (1999). Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France, Tome 2 :334-337, PARIS : Ed Lechevalier.
- [9] : MOUALKIA, H, GOURMATI, M, (2005), Mémoire de Mastère Détermination de substances naturelles à potentialités antioxydante et anti- inflammatoire de plantes Punica granatum L et Lawsonia inermis, Université de Constantine, p13.
- [10] : BAKHTAOUI. H, (2019), Mémoire de Mastère Effet des extraits phénoliques des écorces de Grenade (Punica granatum.L) sur l'évolution des paramètres physicochimiques et microbiologiques d'un lait fermenté de type yaourt, Université de Mostaganem, p5, 6, 7, 14, 17, 18,19.
- [11] : CAUCHARD, P (2013), Mémoire de Magistère, La grenade : Organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement, Agrocampus d'Angers, p6.
- [12] : WALD, : E. (2009), Thèse de Doctorat Le grenadier (Punica granatum) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes, Université de Lorraine.
- [13] : KUMARI A. DORA, J. KUMAR, A (2012), Pomegranate (Punica granatum) Overview. International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences, 1, 1218-1222.
- [14] : QUIROZ, I. (2009). Granados, perspectivas y oportunidades de un negocio emergente: Antecedentes de Mercado. Fundacion Chile. P 72. 117.



Références Bibliographiques

- [15] : MELGAREJO. P., VALERO, D. (2012). International Symposium on the Pomegranate. Edition Zaragoza, Ciheam, Spain.337p.
- [16] : INRAA,2006. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétique pour l'alimentation et l'agriculture.
- [17] : SPICHIGER R.-E., SAVOLAINEN V. V., FIG M. ET JEANMONOD D. (2009). Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 2ème éd., Presses Polytechniques et universitaires, Lausanne, p : 286- 287. ISBN : 2-88074-502-0.
- [18] : BENYAHKEM M.L, HADJADJ S, OTHER, (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.
- [19] : 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.
- [20] : LANSKY E.P, NEWMAN R.A, (2007) : *Punicagranatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer, *Journal of Ethnopharmacology*.
- [21] : B.J, (1999) : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Revue et Augmentée, Tec & Doc, Paris.
- [22] : BÄRTELS A, (1998) : Guide des plantes du bassin méditerranéen, E. Ulmer.
- [23] : STOVER E, MERCURE E.W, (2007). The pomegranate: à Newlook at the fruit of paradise, HortScience.
- [24] : MARTINEZ J, MELGAREJO P, HERNANDEZ F, SALAZAR D, MARTINEZ R., (2006) : Seed characterisation of five new pomegranate (*Punicagranatum* L.) varieties, *ScientiaHorticulturae*.
- [25] : BETIOUI M, (2017) : Etude de la possibilité d'amélioration de la culture et de la production du Grenadier commun, *Punicagranatum* L. dans la région de Tlemcen.
- [26] : MEERTS I.A.T.M., VERSPEEK-RIP C.M., BUSKENS C.A.F., KEIZER H.G., BASSAGANYA-RIERA J., JOUNI Z.E., VAN HUYGEVOORT A.H.B.M., VAN OTTERDIJK F.M. ET VAN DE WAART E.J. (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Chemical Toxicology* 47 : 1085– 1092
- [27] : KIM N. D., MEHTA R., YU W., NEEMAN I., LIVNEY T., AMICHAY A., POIRIER D., NICHOLLS P., KIRBY A., JIANG W., MANSEL R., RAMACHANDRAN C., RABI T., KAPLAN B. ET LANSKY E. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71 ; 203–217.
- [28] : OKONOZI S., DUANGRAT C., ANUCHPREEDA S., TACHAKITTIRUNGROD S. ET CHOWWANAPHOONPHON S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103 : 839–846.



Références Bibliographiques

- [29] : GIL M. I., TOMS-BARBERN F. A., HESS-PIERCE B., HOLCROFT D. M. ET KADER A. A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.*, 48 : 4581-4589.
- [30] : VIDAL A., FALLARERO A., PEÑA B. R., MEDINA M. E., GRA B., RIVERA F., GUTIERREZ Y. ET VUORELA P. M. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 89 : 295–300.
- [31] : RIGHI H ET AL, (2021) : Phytochimie et activité antioxydante du genre *Thymus* (synthèse théorique), Mémoire master académique, université de Msila.
- [32] : HOPKINGS WILLIAM.G, (2003). *Physiologie végétale*, 2ème édition de Boeck, P267-283.
- [33] : HYNES M.J, O'COINCEANAINN M. (2001). The kinetics and mechanisms of the reaction of iron (III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85(2-3) : 131–142.
- [34] : KAKHLON O et CABANTCHIK Z.I. (2002). The labile iron pool : characterization, measurement, and participation in cellular processes I. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(8), 1037–1046.
- [35] : CLIFFORD M.N. (1999). Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea Washington. DC, CRC Press, Boca Raton Florida, 41 (5), 393-397.
- [36] : GHEDIRA K. (2005). Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 04, 162-169.
- [37] : HAKKINEN S.H., KARENLAMPI S.O., HEINONEN I.M., MYKKANEN H.M. et TORRONEN A.R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47,2274-2279.
- [38] : PSOTOVA J., KOLAR M., SOUSEK J., SVAGERA Z., VICAR J. et ULRICHOVA J. (2003). Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytother Res*, 17(9),1082-7.
- [39] : BRUNETON J. (2008). Acides phénols. In : *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. Pp 198-260.
- [40] : AGUILERA-CARBO, A., AUGUR, C., PRADO-BARRAGAN, L. A., FAVELATORRES, E., & AGUILAR, C. N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 189-199.
- [41] : VIUDA-MARTOS, M., FERNANDEZ-LOPEZ, J., & PEREZ-ÁLVAREZ, J. A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654.
- [42] : GUILLAUME, C, FLAMMANG, P., RAKOTORISOA, P., GERBAUX, P., DEMEYER, M., & EECKHAUT, I. (2013). Preservation of the bioactive saponins of *Holothuria scabra* through the processing of trepang.



Références Bibliographiques

- [43] : GUILLAUME, D., & CHARROUF, Z. (2005, DECEMBRE). Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*).
- [44] : ANDRIAMISAINA ANDRIAMASINARO, N. (2018). Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs activités biologiques.
- [45] : YINYANG, J., MPONDO MPONDO, E., TCHATAT, M., NDJIB, R. C., MVOGO OTTOU, P. B., & DIBONG, S. D. (2014). Les plantes à alcaloïdes utilisées par les populations de la ville de Douala (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 78(1), 6600.
- [46] : AIT-ALI, E., EL BELMALHA KHETABI, A., S., & LAHLALI, R. (2021). Use of plant extracts against post-harvest fruit diseases. 9, 170-179.
- [47] : Mme NAAS NEE ZERROUKI, N. (2009). Contribution à l'étude phytochimique de la plante *Teraclinise articulata* Activité biologique et biochimique de la plante.
- [48] : SOULAMA, S., NACOUлма, O., NAGTIERO MEDA, R., BOUSSIM, J., & MILLOGO-RASOLODIMBY, J. (2014). Teneurs en coumarines de 15 ligneux fourragers du Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(6), 2283.
- [49] : KONE, D. (2008). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes : Extraction, identification d'alcaloïdes—Caractérisation, quantification de polyphénols : Étude de leur activité antioxydante. 189.
- [50] : ABDELOUHAB, K. (2021). Activités antiinflammatoires et antiarthritiques d'extraits de *hertha cherifolia* chez la souris et le rat avec arthrite rhumatoïdes expérimentale. Université Ferhat Abbas, Sétif 1 Faculté des sciences de la nature et de la vie.
- [51] : BURT S, (2004). Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in food – a review. *International journal of food microbiology*, 94 : 223-253.
- [52] : ARTE M.C.T., FINGUEIRA G.M., SARTORATTO., REHDER V.L.G AND DELARMELINA C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305-311.
- [53] : KOKA K, SANDA K., RAYNAUD C., NENONENE Y.A., MILLET J. ET CHAUMONT J.P. (2004). Activité antimicrobienne d'huile essentielle de *trios Cymbopogon* sp. Africains vis-à-vis de germe pathogène d'animaux de compagnie. *Ann. Méd. Vét.* 148 : 202-206
- [54] : ISMAN M.B. (2000). Plant essential oils for pest ans disease management. *Crop protection*, 19(8), 603-608
- [55] : VALNET J. (2000). Aromathérapie. Ed. Maloine S. A.alteration of *saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res.* 19(5), 405-8.
- [56] : SITZIA G., 2009 : La Grenade, une bombe de jeunesse.
- [57] : LARAQUI H, (2007). Docteur de l'université Louis pasteur « Etude phytochimique »



Références Bibliographiques

- [58] : RASHANTH D ET ASHA M.K (2001). Antibacterial activity of Punica granatum. *Fitoterapia*. 2001. N°72. Pages 171-173.
- [59]: JACOB J, LAKSHMANAPERMALESAMY L., ILLURI D., BHOSLE D., SANGLI G.K. ET MUNDKINAJEDDU D. (2018). In vitro evaluation of antioxidant potential of isolated compounds and various extracts of peel of punica granatum L. *Pharmacognosy res* 10 (1): 44-48.
- [60]: TZULKER R, GLAZER I., BAR-ILAN I., HOLLAND D., AVIRAM M. ET AMIR R. (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 55, 9559-9570.
- [61]: HEINECKE J.W. (2006). Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander? *Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 813-6.
- [62]: SAHEBKAR A, FERRI C, GIORGINI P, BO S, NACHTIGAL P, GRASSI D (2016): Effects of pomegranate juice on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res*. 2017 Jan;115: 149-161. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.018. Nov 23. PMID: 27888156.
- [63]: FADAVI A, BARZEGAR M. ET AZIZI M. H. (2006). Determinations of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 676–680.
- [64]: AVIRAM, M., DORNFELD, L., KAPLAN, M., COLEMAN, R., GAITINI, D., NITECKI, S., HOFMAN, A., ROSENBLAT, M., VOLKOVA, N., PRESSER, D., ATTIAS, J., HAYEK, T., FUHRMAN, B. (2002). Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular disease: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Under Exp. Clin. Res*. 28, 49–62.
- [65]: HALENG, J., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, JO., CHARLIER, C., & CHAPELLE, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de liege*, 62(10) ,628-38.
- [66]: KOPPENOL, WH. (2001). The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Rep* ; 6 :229–34.
- [67]: GILGUN-SHERKI, Y., MELAMED, E., AND OFFEN, D. (2001). Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40: 959-975.
- [68]: COYLE, P., PHILCOX, JC., CAREY, LC., ROFE, AM. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*; 59:627-47.
- [69]: KNIGHT, JA. (2001). The biochemistry of aging. *Adv Clin Res* 2001 ; 35 : 1-62.
- [70]: NOVELLI, GP. (1997). ROLE OF FREE RADICALS IN SEPTIC SHOCK. *J PHYSIOL PHARMACOL* ; 48 : 517-27., G.P.1997 ; OLDHAM, K.M ET AL.1998) ; (OLDHAM, KM., BOWEN, PE. (1998). Oxidative stress in critical care : is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc* ; 98 : 1001-8.)



Références Bibliographiques

- [71]: HALLIWELL, B., AND GUTTERIDGE, J. M. C. (2007): Free Radicals in Biology and Medicine, (3rdéd. pp. 31-98). Oxford : Oxford University Press.
- [72]: OLDHAM, KM., BOWEN, PE. (1998). OXIDATIVE STRESS IN CRITICAL CARE : IS ANTIOXIDANT SUPPLEMENTATION BENEFICIAL, J AM DIET ASSOC) ; 98 : 1001-8.; GOODE, HF., WEBSTER, NR. (1993). Free radicals and antioxidants in sepsis. Crit Care
- [73] : FONTAINE, E., BARNOUD, D., SCHWEBEL, C., LEVERVE, X. (2002). Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique.
- [74] : CHOUHAI.O et HOUACINE A, (2018), Contribution à l'évaluation de l'activité antioxydante des deux plantes médicinales : thymus hirtus et Rosmarinus tournefortii ; mémoire fin de cycle en science alimentaires, option : qualité des produits et sécurité des aliments.
- [75]: GUTTERIDGE, JM. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence Free Radic Res Commun; 19:0141-58.
- [76] : MARTINEZ-CAYUELA M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. Biochem. Vol.77 :147-161.
- [77] : PASQUIER C, (1995). Stress oxydatif et inflammation. Revue française des laboratoires, Vol. 276 : 87-92.
- [78]: COTELLE, N. (2001). Rôle of flavonoids in oxidative stress.curr top Med Chem. 1: 569-590
- [79] : HOZAWA, A, JACOBS, D, STEFFES, M., ET AL. (2007). Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction:the Coronary Artery Risk development in young Adults (CARDIA)/ YOUNG Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. Clin chem., 53-19.
- [80] : BOUDJOUREF, M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris L.
- [81] : DEFRAIGNE, J-O. (2005). Un mécanisme physiopathologique central à l'origine des complications du diabète, Rev Med Liege, 60, 472-478.
- [82] : FAVIER A. (2003). Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité chimique, Vol.39 : 108-117.
- [83] : GARDES-ALBERT M, DOMINIQUE BONNEFONT- ROUSSELOT, ZOHREH ABEDINZADEH Z ET DANIEL JORE D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique. Pp : 91-96.
- [84] : JACOTOT B, (1997). Vitamine E et athérosclérose. Rev. Méd. Interne. Vol.15 : 627-629.
- [85] : HANIFI N, (1991). Importance des ressources phyto-génétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication des actes éditions, Vol 16 :47-49



Références Bibliographiques

- [86] : CHOLEWA J, POPRZ ECKI S., ZAJAC A. ET WASKIRWIEZ Z, (2008). Impact de la supplementation en vitamine C sur les paramètres du stress oxydatif dans le sang des basketteurs d'élite lors d'un effort maximal, science & sports, vol .23 : 176-182
- [87] : (MAGDER, S. (2006). Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? Crit Care, 10,208-216.)
- [88]: MEDDOUR A., YAHIA M., BENKIKI N., AYACHI A, (2011). Etude de l'activité antioxydant et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparid spinosa L. lebanese Science Journal 14 (1) : 49-60.
- [89] : LEHUCHER-MICHEL, M.P., LESGARDS, J.F. ; DELUBAC, O., STOCKER, P., DURAND, P., & PROST, M, (2001). Stress oxydant et pathologies humaines : Bilan et perspectives preventives. La presse médicale, 30(2), 1076-1081.
- [90] : PASTRE, J. (2005). Intérêt de la supplementations en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques (Doctoral dissertation).
- [91] : ATTOU A. (2011). Contribution à l'étude photochimique et activités biologiques des extraits de la plante ruta chalepensis (fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.
- [92] : MEZITI A. (2009). Activité antioxydant des extraits des graines de Nigella sativa L : étude in vitro et in vivo. Mémoire de magister. Université El-Haj Lakhdar. Batna.
- [93] : PACIFICCHRISTOPHE, 2006, Les formes pharmaceutiques.
- [94] : Richard. J, Benoit J -P, (2000). « Microencapsulation, techniques de l'ingénieur », J-2210.1-20.
- [95] : RABEAU, S. (2009) ; « Étude d'un procédé continu de microencapsulation, » Institut National Polytechnique de Lorraine, [Online]. Available: <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748744>
- [96]: R. DUBEY, T.C. SHAMI, K.U. BHASKER RAO, JANUARY (2009), « Microencapsulation Technology and Applications », Defence Science Journal, Vol. 59, No. 1, pp. 82-95
- [97]: H. DUMER, H. NIGAM, A.M. TAMBOLI, M.S.M. NAINAR, (2011). « Microencapsulation process, Techniques and Applications », International journal of Research in pharmaceutical and Biomedical Science ISSN : 2229-3701, Vol. 2(2).
- [98]: J. DJEU, (2007). « Films de deux polymère auto-assembles : Chlorhydrate de polylyamine (PHA) et polystyrène sulfonate de sodium (PSS) ; mécanisme de croissance et stabilité », thèse de doctorat, université de Franche-Comté,
- [99] : HE. PEIYUAN, (2009) ; « conception et réalisation d'un système microfluidique pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation », thèse de doctorat, université de



Références Bibliographiques

Technologie de compiègne.

[100] : Y. NAFTI, (2008) ; « contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif oxacilline sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservation », Mémoire d'ingénieur d'état, université Ziane Achour de Djelfa.

[101] : T. FELICIE, (2009) ; « conception et mise en œuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale », thèse de doctorat, université de Toulouse.

[102] : AGNIHOTRI N, MISHRA R, GODA C, ARORA M, (2012); « microencapsulation-A. Novel approach in drug delivery », A review, Indo Glub, J.pharm.sci 2(1),1-20.

[103] : J.P BENOIT, S. BRIANÇON, E. FATTAL, H. FESSI, P. LEGRAND, C. PASSIRANI, (2009) ; Sphéroïdes et formes vectorisées HAL-00385473.

[104] : R. KIEFFER, (2008) ; « contacteurs à membrane pour la précipitation du sulfate de baryum ; simulations numériques et résultats expérimentaux », thèse de doctorat, université Claude Bernard Lyon.

[105] : M. SOCHA, (2008) ; « apport des nanotechnologies dans le domaine des peptides et des protéines ; application à l'absorption par voie orale et à la furtivité », thèse de doctorat, université Henri Poincaré-Nancy 1.

[106] : JOËL. R, JEAN-PIERRE. B, (2013) ; « microencapsulation technique de l'ingénieur », J.2211, pp2-20, (2013).

[107] : VANDAMME T, PONCELET D., SUBRA-PATERNAULT, (2007)
Microencapsulation : des sciences aux technologies, Tech et Doc, Paris.

[108] : MADENE A., JACQUOT M., SCHER J., DESORBY S., (2006): Flavour encapsulation and controlled release – a review, International Journal of Food Science and Technology, Vol. 41,1 – 21

[109] : PONCELET D., (2000): Pourquoi s'intéresser à la micro- et nanoencapsulation, actes du séminaire Euroforum micro- et nanoencapsulation, 22 et 23 mars, Paris; séminaire organisé par Euroforum, 35, Paris. [Http://www.euroforum.fr](http://www.euroforum.fr).

[110] : BESSON M, (2008) : principe de la pharmacocinétique appliquée à la clinique. Service de pharmacologie et toxicologie cliniques des hôpitaux universitaires de Genève.

[111] : MENDOUME-NZE J.S, (2008) : Les hydrogels et les nanogels : des formes galéniques innovantes pour une libération ciblée des principes actifs. Faculté de pharmacie, Université de Nantes.

[112] : A.H. BOUDENDOUNA, (2010) : méthodologie de la formulation d'une forme orale solide à libération prolongée. Institut national polytechnique, (246).



Références Bibliographiques

- [113] : A. LAHNIN, (2002) ; les formes galéniques orales à libération modifiée » thèse de doctorat, université cheikh diop dakar, 2002.
- [114] : S. NICOLI, P. (2001) ; Colombo. Libération contrôlée des médicaments, voies et formes utilisées. Annales pharmaceutiques françaises (59, 227-231).
- [115] : T.M. LUDDEN, (1991) ; non-linear pharmacokinetics, clin pharmacokinet,(429-446).
- [116]: M. RAPHAEL, (2005); ottenbrite, controlled-release technology”in epse 2nd ed.suppl. Vol., virginia commonwealth university, (164–186).
- [117] : H. IDRISOU, K. KACIMI, (2012); formulation d’un système matriciel a libération contrôlée par microencapsulation de l’amlodipine (bésylate) danshpmc-euragit-peg, université de a. Mira Bejaia.
- [118] : S. SHAH, Y. (1992) ; Cha, poly (glycolic acid-co-dl-lactic acid) diffusion or degradation controlled drug delivery, j controlled release, (18(3), 261-270).
- [119]: P. COSTA, J. MANUEL, S. LOBO, (2001); modeling and comparaison of dissolution profiles, (123-133).
- [120]: N.A. PEPPAS ET R. LANGER, (1994); new challenges in biomaterials science, (263,1715-1720).
- [121]: Y.W. CHIEN, (1992); fundamentals of rate-controlleddrug delivery in:y.w.chien(ed.),novel drug delivery systems, marcel dekker,new York, (43-138).
- [122]: J. AIACHE, M.AIACHE, S.RENOUX,(2001); initiation a la connaissance du médicament. 4th ed; masson: paris.
- [123]: J. GOOLE, (2008); développement et evaluation de mini comprimé flottants à libération prolongée thèse de doctorat en science pharmaceutique, université de bruxelles.
- [124] : M. HEKROUNE, (2008) ; Etude de comparative de deux techniques de séchage (convection et micro-onde) par application des plans d’expérience. Cas du fruit de datte [Mémoire de Magister]. Boumerdes : Université de Boumerdes, Faculté des Sciences de l’Ingenieur, P13.
- [125] : R. LINDER, (2005). Les plans d’expériences un outil indispensable à l’expérimentateur. Presses de l’école nationale des ponts et chaussées, Paris.
- [126] : H. TOUATI, (2019) ; Adsorption de trichlorophénol par une dolomie modifiée [Mémoire de Master]. Université de Mostaganem, Faculté des Sciences et de la Technologie, P46.



Références Bibliographiques

- [127] : A. BELGHARBI, S. ABIB (2016) ; Utilisation des plans expérience pour la formulation des pates cimentaires auto-plaçants [Mémoire de Master]. Université de Bouira, Faculté des Sciences et Sciences Appliquées, P51.
- [128] : W. MEGHACHOU, (2014) ; Approche méthodologique à la modélisation par les plans d'expériences pour l'élaboration d'un yaourt [Mémoire de Magister]. Université d'Oran, Faculté des Sciences, P21.
- [129] : J. GOUPY, (2006) ; Faites connaissance avec la méthode des plans d'expériences. Introduction aux plans d'expériences. 3eme édition. Paris : Dunod, P6.
- [130] : T. BELKADI, L. MAKKED, (2016) ; Traitement des margines d'olives par co-precipitation en utilisant les plans d'expériences [Mémoire de Master. Université de Tizi-Ouzou, Faculté des sciences, P13.
- [131] :D. MILOUD, (2019) ; Etude de l'évolution de logiciel : approche par plan d'expériences [Thèse de Doctorat]. Université d'Oran, Faculté des Sciences Exactes et Appliquées, P66.
- [132] : J. GOUPY, (2000) ; Modélisation par les plans d'expériences. Techniques de l'ingénieur. Mesures et contrôle R275.
- [133] : H. HANEN, W. TINSSON, (2009) ; Plans d'expérience pour mélange de mélanges.
- [134] : J. FAUCHER, (2006) ; Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Thèse de doctorat
- [135] : P. TRIBOULET, (2008) ; Notions de bases sur les plans d'expériences. Lycée Niepce-Chalon Sur Saône.
- [136] : M. AYAD, Y. BARKA, (2013) : modélisation des bétons ordinaires par des plans d'expériences, université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
- [137] : Que sont les plans de surface de réponse, les plans composites centrés et les plans de Box-Behnken consulté à l'adresse [https ;//support.minitab.com/](https://support.minitab.com/)
- [138]: Z. MOHAMMEDI, (2005) « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen ». Thèse de Magistère. Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen.
- [139]: M. PATIL, SHIVAPRASKASH, B. V, (2013). Pharmacology and Clinical Use of Diethyl Sulfoxide (DMSO): A Review. International Journal of Molecular Veterinary Research 2013, 3 (6), 23– 33.
- [140]: H. FALLEH, R. KSOURI, K. CHAIEB, N. KARRAY-BOURAOUI, N. TRABELSI, M. BOULAABA AND C. ABDELLY. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt. Rend. Biol.* Vol. 331. pp. 372-379



Références Bibliographiques

- [141] : PAREJO I, VILADOMAT F, BASTIDA J, ET AL. (2003) Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci* 73:1667–81
- [142] : Z. MAKHLOUFI, C. MAMERI. (2021) « Extraction et évaluation des propriétés antioxydantes et antibactériennes de la plante *Thymus vulgaris*. Application à la formulation d'une pommade » Mémoire de Master. Université ABDERRAMANE MIRA Bejaia
- [143]: OMEZ-CARAVACA, A.M., GOMEZ-ROMERO, M., ARRAEZ-ROMAN, D., SEGURACARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41:1220-1234.
- [144]: AMAROWICZ, R., TROSZYNSKA, A., SHAHIDI, F. (2005). Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J food lipids*. 12 : 344-358.
- [145] : IDRISOU H & KACIMI K (2013). « Formulation d'un système matriciel à libération par microencapsulation de l'amlodipine (bésylate) dans HPMC- Eudragit® - PEG ».
- [146] : RYAN, M. T., MULLER, H., & PFANNER, N. (1999). Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J BiolChem*, 274 (29), 20619 – 20627.
- [147]: CONDE. E, CARA. C, MOURE. A, RUIZ. E, CASTRO. E. & DOMINGUEZ. H. (2009). Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, 114 (3), 806 – 812
- [148] : GOUPY. J (2001), « Introduction aux plans d'expériences » Dunod. Paris, pp303.
- [149] : MERKEN, H.M., BEECHER, G.R. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatography A*. 897 : 177-184

Annexe





1. Matériels et réactifs utilisés :

Verrerie	Réactifs	Appareillages utilisés
<ul style="list-style-type: none"> - Eprouvettes graduée, pipette graduée. - Erlenmeyer, Fioles jaugées, Béchers. - Verres de montre, Entonnoirs, spatules, barreau magnétique, pissette, tubes à essais. - cuves en quartz pour l'UV - Boîtes pétries. - Papier absorbant, papier aluminium, papier wattman, para film. - poires d'aspiration. - Mortier, tamis de 100um. 	<ul style="list-style-type: none"> - Eau distillé. - Ether de pétrole (EP). - Dichlorométhane (DCM). - Méthanol (MeOH). - Ethanol. - Acide acétique. - Standards (acide gallique, quercétine, thymol). - Folin Ciucaleu. - DPPH (2,2-déphenyl-1-picrylhydrazyle). - Chlorure d'aluminium (AlCl₃). - Carbonate de sodium (NaCO₃). - Huile de vaseline. - PEG, Dextrine. - Glutaraldéhyde. -HCl. -NaOH. 	<ul style="list-style-type: none"> - Spectrophotomètre UV-visible. - Balance analytique de précision à 4 chiffres. - PH-mètre. - Dissolu-test. - HPLC. - Spectrophotomètre IR. - Etuve memmert.

2. Cinétique de libération :

2.1. Les valeurs des absorbances des polyphénols, flavonoïdes et l'activité antioxydant :

T (min)	Abs (nm) polyphénols	Abs (nm) flavonoïdes	Abs (nm) DPPH
2	0.108	0.071	0.643
10	0.171	0.063	0.574
20	0.098	0.054	0.647
30	0.073	0.046	0.643
40	0.039	0.124	0.629
50	0.074	0.052	0.610
60	0.044	0.059	0.650



70	0.084	0.069	0.632
80	0.085	0.051	0.0627
90	0.110	0.053	0.583
100	0.048	0.057	0.637
110	0.039	0.058	0.646
120	0.050	0.061	0.662

4. Appareils utilisés :



UV-Visible



PH-mètre



Balance électronique



plaque d'agitation magnétique

5. La microparticule que on à réaliser (essai 4) :



Résumé



Résumé

En résumé, notre étude porte sur l'analyse des extraits d'écorce de grenade afin d'identifier certains groupes chimiques, tels que les polyphénols totaux et les flavonoïdes, qui pourraient avoir des activités intéressantes. Les concentrations de ces composés ont été déterminées à l'aide de différentes méthodes analytiques. De plus, nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits et avons utilisé l'extraction par solvant. Nos résultats ont montré que les extraits peuvent agir comme des pièges à radicaux, avec une capacité de neutralisation plus marquée du radical libre (DPPH) observée dans l'extrait polaire (MeOH). Ensuite, nous avons étudié la formulation de microparticules par microencapsulation de l'extrait méthanolique à l'aide de polymères biodégradables. En variant les doses, le rapport polymère et le pH, nous avons cherché à trouver la méthode d'encapsulation optimale. L'analyse statistique réalisée grâce à un plan d'expérience factoriel et le logiciel MINITAB nous a permis d'identifier les facteurs les plus significatifs et leur impact sur le taux d'encapsulation des polyphénols et des flavonoïdes. De plus, nous avons étudié l'influence du milieu physiologique intestinal sur la cinétique de libération in vitro du principe actif "punica granatum".

Mots clés : écorce de grenade, activité antiaxydant, polyphénols, formulation, principes actifs, cardiovasculaires, Cinétique de libération,

Abstract

In summary, our study focuses on the analysis of extrants from pomegranate peel to identify certain chemical groups, such as total polyphenols and flavonoids that could have interesting activities. The concentrations of these compounds were determined using various analytical methods. Additionally, we evaluated the antioxidant activity of the extracts and employed solvent extraction. Our results demonstrated that the extracts can act as radical scavengers, with a more pronounced capacity for neutralizing the free radical (DPPH) observed in the polar extract (MeOH). Subsequently, we investigated the formulation of microparticles through the microencapsulation of the methanolic extract using biodegradable polymers. By varying the doses, polymer ratio, and pH, we aimed to find the optimal encapsulation method. Statistical analysis using a factorial experimental design and the MINITAB software allowed us to identify the most significant factors and their impact on the encapsulation rate of polyphenols and flavonoids. Furthermore, we examined the influence of the intestinal physiological environment on the in vitro release kinetics of the active compound "punica granatum".

Keywords: Pomegranate peel, Antioxidant activity, Polyphenols, Formulation, Active compounds, Cardiovascular, Release kinetics.