

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث و العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université IBN KHALDOUN Tiaret.

Faculté de science de la nature et de vie.

Département de biologie.



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique.

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.

Filière : Sciences biologiques.

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire.

Présenté par :

- BAGHDADI Khaled
- AIT YEHIETEN YAHIA

Thème

***Punica granatum* L : Ethnopharmacologie, phytochimie,
cytotoxicité, et génotoxicité**

Jurys :

Président : Dr. ACHIR M.

Promoteur : Dr. SOUANA K.

Examineur : Dr. BOUSAID M

Année universitaire 2024-2025

الملخص

تندرج هذه الدراسة ضمن إطار تثمين مستدام للمخلفات الزراعية، مع التركيز بشكل خاص على قشور وأوراق الرمان (*Punica granatum L.*) ، التي تُستخدم تقليدياً في الجزائر. وقد أكدت الدراسة الإثنوفارماكولوجية، التي أجريت على 138 مشاركاً من عدة مناطق من البلاد، الدور المحوري للعشابين في نقل المعارف المتعلقة بالاستخدامات الطبية لهذه النبتة، المعروفة بخصائصها المضادة للالتهابات والمساعدة على الهضم والمضادة للإسهال.

أظهرت التحاليل الفيتوكيميائية محتوى مرتفعاً من البوليفينولات في المستخلص الإيثانولي للقشور (0.52 ملغ حمض الغاليك/مل)، واستخلاصاً مثالياً للتانينات بواسطة الماء (حتى 70 ملغ مكافئ حمض التانيك/مل في المنقوعات). وتبرز هذه النتائج إمكانات هذه المخلفات النباتية كمصادر لجزيئات نشطة حيويًا ذات أهمية للصناعات الصيدلانية والغذائية.

أما التقييم السيتوجينوتوكسي (اختبار *Allium cepa*) فقد أظهر تأثيرات تعتمد على الجرعة: تحفيزاً معتدلاً لنمو الجذور مع المنقوع (5-10 ملغ/مل)، وبلوغ أعلى مؤشر انقسام خلوي (30%) مع المستخلص المائي عند تركيز 1 ملغ/مل، وظهور اضطرابات في دورة الخلية عند الجرعات الأعلى. وقد أدت المستخلصات الإيثانولية أساساً إلى ظواهر الالتصاق وتكوّن النوى الصغيرة، في حين ارتبطت المستخلصات المائية بزيادة التعدد الصبغي؛ إلا أن هذه التأثيرات الجينوتوكسية بقيت أقل من تلك المسجلة مع الشاهد الإيجابي.

ختاماً، تؤكد هذه الدراسة قيمة قشور وأوراق الرمان كمصادر متجددة، سواء في الحفاظ على المعارف التقليدية أو في استخلاص المركبات النشطة حيويًا، وذلك في إطار تثمين متكامل واقتصاد دائري. وتظل هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لضمان الاستخدام الآمن لهذه المستخلصات.

الكلمات المفتاحية :

Punica granatum L.، الاقتصاد الدائري، التثمين، المخلفات الزراعية، الإثنوفارماكولوجيا، الفيتوكيمياء، السمية الخلوية، السمية الجينية، اختبار *Allium cepa* ، المركبات النشطة حيويًا، الطب التقليدي.

Résumé

Cette étude s'inscrit dans une logique de valorisation durable des sous-produits agricoles, en particulier les écorces et feuilles du grenadier (*Punica granatum* L.), traditionnellement utilisées en Algérie. L'enquête ethnopharmacologique, menée auprès de 138 participants issus de plusieurs régions du pays, a confirmé la prééminence des herboristes dans la transmission des savoirs sur les usages médicinaux de cette espèce, reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires, digestives et antidiarrhéiques.

Les analyses phytochimiques ont mis en évidence une forte teneur en polyphénols dans l'extrait éthanolique des écorces (0,52 mg GAE/mL) et une extraction optimale des tanins par l'eau (jusqu'à 70 mg TAE/mL dans les infusions). Ces résultats soulignent le potentiel de ces résidus végétaux comme sources de molécules d'intérêt pour les industries pharmaceutique et agroalimentaire.

L'évaluation cytogénotoxique (test *Allium cepa*) a révélé des effets dose-dépendants : stimulation modérée de la croissance racinaire pour l'infusion (5–10 mg/mL), indice mitotique maximal (30 %) avec l'extrait aqueux à 1 mg/mL, et apparition de perturbations du cycle cellulaire à doses plus élevées. Les extraits éthanoliques ont principalement induit des phénomènes de stickiness et de micronoyaux, tandis que les extraits aqueux étaient associés à des polyploïdies, mais ces effets génotoxiques sont restés inférieurs à ceux du contrôle positif.

En conclusion, l'étude confirme la valeur des écorces et feuilles de grenadier comme ressources renouvelables, à la fois pour la préservation des savoirs traditionnels et pour l'extraction de composés bioactifs dans une optique de valorisation intégrée et d'économie circulaire. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour garantir une utilisation sécuritaire de ces extraits.

Mots-clés

:

Punica granatum L., économie circulaire, valorisation, sous-produits agricoles, ethnopharmacologie, phytochimie, cytotoxicité, génotoxicité, *Allium cepa*, composés bioactifs, médecine traditionnelle.

Abstract

This study is situated within a framework of sustainable valorization of agricultural by-products, focusing particularly on the peels and leaves of pomegranate (*Punica granatum* L.), which are traditionally utilized in Algeria. An ethnopharmacological survey conducted among 138 participants from various regions of the country confirmed the predominant role of herbalists in the transmission of knowledge regarding the medicinal uses of this species, renowned for its anti-inflammatory, digestive, and antidiarrheal properties.

Phytochemical analyses revealed a high polyphenol content in the ethanolic extract of the peels (0.52 mg GAE/mL) and optimal extraction of tannins by water (up to 70 mg TAE/mL in infusions). These findings underscore the potential of these plant residues as sources of bioactive molecules of interest for the pharmaceutical and agri-food industries.

The cytogenotoxic evaluation (*Allium cepa* test) demonstrated dose-dependent effects: moderate stimulation of root growth with the infusion (5–10 mg/mL), a maximal mitotic index (30%) with the aqueous extract at 1 mg/mL, and the emergence of cell cycle disturbances at higher doses. Ethanolic extracts primarily induced phenomena such as stickiness and micronuclei, whereas aqueous extracts were associated with increased polyploidy; however, these genotoxic effects remained lower than those observed with the positive control.

In conclusion, this study confirms the value of pomegranate peels and leaves as renewable resources, both for the preservation of traditional knowledge and for the extraction of bioactive compounds within an integrated valorization and circular economy approach. Further research is necessary to ensure the safe use of these extracts.

Keywords:

Punica granatum L., circular economy, valorization, agricultural by-products, ethnopharmacology, phytochemistry, cytotoxicity, genotoxicity, *Allium cepa*, bioactive compounds, traditional medicine.

Remerciement

Au terme de ce travail de recherche, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de mémoire, Monsieur Souana, ainsi qu'à Monsieur Taibi, pour leur disponibilité constante, leurs conseils avisés et leur bienveillance tout au long de ce parcours. Leur rigueur scientifique et leurs encouragements ont été déterminants dans l'aboutissement de ce travail.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail et dont les remarques constructives permettront d'enrichir ma réflexion.

Mes sincères remerciements vont à l'ensemble du personnel du laboratoire qui m'a accueilli et fourni les conditions optimales pour mener à bien mes expérimentations. Leur expertise technique et leur soutien quotidien ont été précieux.

Je tiens à remercier particulièrement mes collègues chercheurs tout le promo de biologie moléculaire pour les échanges stimulants et les discussions enrichissantes.

Ma gratitude s'étend également aux communautés locales qui ont partagé leurs connaissances traditionnelles sur l'usage des plantes médicinales, contribuant ainsi à la dimension ethnopharmacologique de cette recherche.

Un grand merci à ma famille pour son soutien indéfectible, sa patience et ses encouragements constants. Votre présence à mes côtés a été une source inépuisable de motivation.

Enfin, je remercie mes amis qui ont su m'apporter le soutien moral nécessaire dans les moments de doute et partager les instants de joie tout au long de cette aventure académique.

À tous ceux qui ont cru en ce projet et qui m'ont accompagné dans cette démarche scientifique

Dédicace

A celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait,

A mon Père

A celle qui a attendu avec patience, je suis le fruit de sa bonne éducation,

A ma Mère

Sachez que je vous aime profondément et que je vous suis très reconnaissant pour votre patience, vos efforts, vos conseils et toutes les souffrances que vous avez endurées. Soyez infiniment remerciés et que Dieu vous accorde une longue et heureuse vie.

Mon frère Mohamed, et mes chères sœurs Asma, Fatima, Hadjer, et Chaima

A mes très chères amis Yahia, Yaser, Sido, Rayan, Abdou, Hamza, Iman, Bouchra, et Kholoud je vous dédie ce travail en témoignage de ma grande affection et en souvenir des agréables moments passés ensemble.

Khaled BAGHDADI

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, pour leur amour, leur soutien inconditionnel et leurs sacrifices tout au long de mon parcours.

À mes frères, pour leur présence, leurs encouragements et leur confiance en moi.

À mes amis, véritables compagnons de route, pour leur aide, leur compréhension et les moments partagés durant ces années d'études.

À tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce mémoire.

Merci du fond du cœur.

AIT YAHIAENE Yahia

Liste des abréviations

P.granatum *Punica granatum* L

ADN Acide Désoxyribonucléique

IM Indice Mitotique

UV Ultraviolet

MMS Méthane sulfonate de Méthyle

HCL Acide chlorhydrique

AC Aberration Chromosomique

ALCL3 Chlorure d'Aluminium

NO Oxyde nitrique

PGE-2 Prostaglandine E2

IL-6 Interleukine 6

IL-8 Interleukine 8 (aussi appelée CXCL8)

CXCL8 C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 (= IL-8)

IL1A Interleukine 1 alpha

TNF Facteur de Nécrose Tumorale

LPS Lipopolysaccharide (endotoxine bactérienne)

RAW 264.7 Lignée de macrophages murins

Caco-2 Cellules humaines de l'épithélium intestinal

PPE Extrait de pelure de grenade

EA acide ellagique

GA acide gallique

Table des figures

Figure 1. Propriétés pharmacologiques des différentes parties de <i>Punica granatum</i> et de ses principaux composés bioactifs	3
Figure 2. Types de mort cellulaire et leurs caractéristiques morphologiques	8
Figure 3. Impact des ponts de chromosomique, et chromosome retardataire sur la division cellulaire et la stabilité génomique	15
Figure 4. Procédures du test Allium cepa.....	21
Figure 5. La répartition par âge des participants.....	24
Figure 6. La répartition des participants selon le sexe	25
Figure 7. La répartition des participants selon le niveau d'études.	26
Figure 8. Répartition des participants selon la fonction.....	26
Figure 9. La répartition des participants selon l'utilisation	27
Figure 10. Fréquences de modes de préparation.	28
Figure 11. La répartition des participants selon les personnes pour qui l'usage est déconseillé	29
Figure 12. Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits aqueux et éthanoliques des écorces de <i>Punica granatum</i> L.	30
Figure 13. Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits d'infusion des écorces de <i>Punica granatum</i> L.....	31
Figure 14. Variation de la teneur en flavonoïdes dans les extraits aqueux et éthanoliques des écorces de <i>Punica granatum</i> L.	32
Figure 15. Variation de la teneur totale en composés flavonoïdes dans les extraits d'infusion des écorces de <i>Punica granatum</i> L.	32
Figure 16. Variation de la teneur totale en tanins dans les extraits aqueux et éthanoliques des écorces de <i>Punica granatum</i> L.....	33
Figure 17. Variation de la teneur totale en tanins dans les extraits d'infusion des écorces de <i>Punica granatum</i> L..	34
Figure 18. Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de <i>Punica granatum</i> L...	

.....	35
Figure 19. Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits d'infusion des feuilles de <i>Punica granatum L.</i>	35
Figure 20. Variation de la teneur en flavonoïdes dans les extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de <i>Punica granatum L.</i>	36
Figure 21. Variation de la teneur totale en flavonoïdes dans les extraits d'infusion des feuilles de <i>Punica granatum L.</i>	37
Figure 22. Variation de la teneur totale en tanins dans les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de <i>Punica granatum L.</i>	38
Figure 23. Variation de la teneur totale en tanins dans les extraits d'infusion des feuilles de <i>Punica granatum L.</i>	38
Figure 24. Nombre de racines avant et après traitement avec des extraits aqueux et éthanoliques des écorces	39
Figure 25. Nombre de racines avant et après traitement avec des extraits d'écorce de l'infusion	40
Figure 26. Longueur des racines avant et après traitement avec des extraits aqueux et éthanoliques d'écorces.	41
.....	41
Figure 27. Longueur des racines avant et après traitement par l'infusion des extraits d'écorces.....	42
.....	42
Figure 28. Nombre de racines avant et après traitement avec des extraits des feuilles.....	42
Figure 29. Nombre de racines avant et après traitement par l'infusion des extraits des feuilles..	43
Figure 30. Longueur des racines avant et après traitement avec des extraits des feuilles.....	44
Figure 31. Longueur des racines avant et après traitement par l'infusion des extraits des feuilles	45
Figure 32. Effet des extraits de <i>Punica granatum L</i> sur l'IM et les phases mitotiques dans les cellules racinaires d' <i>Allium cepa.</i>	45
Figure 33. Effet des extraits de <i>Punica granatum L</i> sur la prophase dans les cellules racinaires d' <i>Allium cepa.</i>	46
Figure 34. Effet des extraits de <i>Punica granatum L</i> sur la métaphase dans les cellules racinaires d' <i>Allium cepa.</i>	47
Figure 35. Effet des extraits de <i>Punica granatum L</i> sur l'anaphase dans les cellules racinaires d' <i>Allium cepa.</i>	48
Figure 36. Effet des extraits de <i>Punica granatum L</i> sur la télophase dans les cellules racinaires d' <i>Allium cepa.</i>	49
Figure 37. Effet dose-dépendant de l'infusion sur l'indice mitotique des cellules	

méristématiques d' <i>Allium cepa</i>	50
Figure 38 Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en prophase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i>	51
Figure 39. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en métaphase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i>	51
Figure 40. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en anaphase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i>	52
Figure 41. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en télophase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i>	53
Figure 42. Effet des extraits de <i>Punica granatum L</i> sur l'IM et les phases mitotiques dans les cellules racinaires d' <i>Allium cepa</i>	54
Figure 43. Effet des extraits de <i>Punica granatum L</i> sur la prophase dans les cellules racinaires d' <i>Allium cepa</i> ..	55
Figure 44. Effet des extraits de <i>Punica granatum L</i> sur la métaphase dans les cellules racinaires d' <i>Allium cepa</i>	56
Figure 45. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en anaphase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i>	57
Figure 46. Effet dose-dépendant de l'infusion sur l'indice mitotique des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i>	58
Figure 47. Effet dose-dépendant de l'infusion sur l'indice mitotique des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i>	59
Figure 48. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en prophase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i>	59
Figure 49 Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en métaphase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i>	60
Figure 50. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en anaphase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i>	61
Figure 51. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en télophase dans les méristèmes racinaires d' <i>Allium cepa</i> ..	61
Figure 52. Les aberrations chromosomiques induite par les déférents concentrations des extraits de <i>Punica granatum L</i>	69

Liste des tableaux

Tableau 1. Avantages et limites des méthodes d'évaluation de la cytotoxicité	10
Tableau 2. Rendement des extraits des écorces	29
Tableau 3. Rendement des extraits des feuilles.....	30
Tableau 4. Aberrations chromosomiques des extraits de <i>Punica granatum l</i> (les feuilles) à différentes concentrations obtenues par le test d' <i>Allium cepa</i>	64
Tableau 5. Aberrations chromosomiques des extraits de <i>Punica granatum l</i> (les écorces) différentes concentrations obtenues par le test d' <i>Allium cepa</i>	67

Table des matières

ملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Table du figures.....	
Liste des tableaux	
Table des matières	
Introduction	
1.1. Nomenclature et classification botanique.....	1
1.2. Description morphologique	1
1.3. Répartition géographique et adaptations écologiques	2
2.1. Usages traditionnels des écorces et feuilles.....	2
2.2. Autres usages (agroalimentaire, cosmétique, teintures naturelles).....	4
3.1. Principaux groupes de composés bioactifs présents dans Punica granatum L.	5
2.3. Principales activités biologiques de Punica granatum L.	6
2.4. Méthodes d'extraction et d'analyses phytochimiques.....	6
2.4.1. Méthodes d'extraction	6
2.4.2. Analyses phytochimiques	7
4.1.Cytotoxicité	7
4.1.1. Définition et utilité de la cytotoxicité.....	7
4.1.2. Techniques d'étude de la cytotoxicité.....	8
4.1.3. Données des études antérieures sur la cytotoxicité du grenadier (Punica granatum).	10
4.1.4. Définition et utilité de la génotoxicité.....	11
4.1.5. Techniques d'étude de la génotoxicité	11
4.1.6. Données des études antérieures sur la génotoxicité du grenadier (Punica granatum)	13
Méthodologie.....	16
1. Méthodologie de l'étude :	17
1.2. Préparation d'extraits de plantes	17
1.3. Composés phytochimiques.....	18
1.3.1. Polyphénols	18
1.3.2 Flavonoïdes.....	19
1.3.3 tanins	19

1.4. Analyse de l'indice mitotique	20
1. Étude ethnopharmacologie	24
1.1. Étude de la répartition par l'âge	24
1.2. Étude de la répartition selon le sexe	25
1.3. Étude de la répartition selon le niveau de vie	25
1.4. Répartition des participants selon la fonction	26
1.5. Étude de la répartition selon l'utilisation.....	27
1.6. Fréquences de modes de préparation.....	27
1.7. Étude de la répartition selon les personnes pour qui l'usage est déconseillé	28
2. Évaluation du rendement d'extraction	28
3. Évaluation des composés phytochimiques pour les écorces	29
3.1.1. Teneur totale en composés phénoliques (les écorces)	29
3.1.2. Teneur totale en composés phénoliques (pour l'infusion)	30
3.1.4. Teneur totale en flavonoïdes (les écorces)	31
3.1.5. Teneur totale en flavonoïdes (pour l'infusion)	31
3.1.6. Teneur totale en tanins (les écorces)	32
3.1.7. Teneur totale en tanins (pour l'infusion).....	33
3. 2. Évaluation des composés phytochimiques pour les feuilles	34
3. 2.1. Teneur totale en composés phénoliques (les feuilles)	34
3. 2. 2. Teneur totale en composés phénoliques (pour l'infusion)	35
3. 2. 3. Teneur totale en flavonoïdes (les feuilles).....	35
3. 2. 4. Teneur totale en flavonoïdes (pour l'infusion)	36
3. 2. 5. Teneur totale en tanins (les feuilles).....	37
3. 2. 6. Teneur totale en tanins (pour l'infusion)	37
4. Évaluation de la cytotoxicité (les écorces)	38
4.1.1. Morphométrie racinaire pour les écorces	38
- Nombre des racines	38
- Nombre des racines pour l'infusion	39
- Longueur des racines	40
- Longueur des racines pour l'infusion.....	40
4.2.1. Morphométrie racinaire pour les feuilles	41
- Nombre des racines	41
- Nombre des racines pour l'infusion	42
- Longueur des racines	43

- Longueur des racines pour l'infusion.....	44
4.3.1. Phases cellulaires (les écorces).....	45
- Indice mitotique	45
- Prophase.....	45
- Métaphase	46
- Anaphase.....	47
- Télophase	48
- Indice mitotique (infusion).....	Erreur ! Signet non défini.
- Prophase.....	49
- Métaphase	Erreur ! Signet non défini.
- Anaphase.....	Erreur ! Signet non défini.
- Télophase	50
4.4.1. Phases cellulaires (les feuilles).....	51
- Indice mitotique	Erreur ! Signet non défini.
- Prophase.....	51
- Métaphase	Erreur ! Signet non défini.
- Anaphase.....	Erreur ! Signet non défini.
- Télophase	52
- Indice mitotique (infusion).....	Erreur ! Signet non défini.
- Prophase.....	52
- Métaphase	Erreur ! Signet non défini.
- Anaphase.....	Erreur ! Signet non défini.
- Télophase	53
5. Évaluation de la génotoxicité	54
- les feuilles	54
- les écorces	55
Discussion	58
Conclusion.....	67
Les références :.....	68

Introduction

Introduction

La valorisation des sous-produits végétaux issus de l'agriculture et de l'agroalimentaire représente aujourd'hui un enjeu majeur tant sur le plan économique qu'environnemental. En effet, les déchets agricoles constituent une source importante de pollution lorsqu'ils sont mal gérés, mais peuvent également être transformés en ressources précieuses grâce à leur richesse en composés bioactifs (Ramos et al., 2017). Parmi ces sous-produits peu exploités figurent l'épicarpe et les feuilles du grenadier (*Punica granatum* L.), largement disponibles dans les régions productrices de cette plante méditerranéenne, notamment en Algérie. Bien que la pulpe et les graines soient largement utilisées pour leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques, l'écorce externe du fruit (épicarpe) et les feuilles sont souvent éliminées comme déchets après la consommation ou la transformation industrielle du fruit (Stagos et al., 2020).

Cependant, des études récentes ont montré que ces parties de la plante renferment des concentrations significatives de composés phénoliques, flavonoïdes, tanins hydrolysables et autres métabolites secondaires dotés d'activités biologiques importantes telles que l'antioxydante, l'anti-inflammatoire, l'antimicrobienne et même l'anticancéreuse (Mandalari et al., 2007). Malgré cela, les données scientifiques concernant ces tissus restent encore limitées, particulièrement pour les feuilles, ce qui entrave toute valorisation rationnelle de ces biomasses souvent sous-exploitées.

En Algérie, *Punica granatum* est cultivé dans les différents étages bioclimatiques, allant du sub-humide au semi-aride, voire l'aride, où il constitue une culture résiliente face aux contraintes climatiques. Outre ses usages alimentaires, le grenadier jouit d'une place notable dans la médecine traditionnelle populaire où il est utilisé pour traiter diverses pathologies, notamment les troubles digestifs, inflammatoires, infectieux et même certains troubles cardiovasculaires (Bellakhdar, 1997 ; Ghanmi et al., 2014). Cependant, ces savoirs empiriques restent rarement documentés ou validés scientifiquement, ce qui soulève la nécessité de les recenser avant qu'ils ne disparaissent avec l'évolution des modes de vie et la perte progressive des traditions orales.

Ainsi, la présente étude s'inscrit dans une démarche pluridisciplinaire visant à combler les lacunes existantes concernant les propriétés ethnopharmacologiques, phytochimiques, cytotoxiques et génotoxiques de l'épicarpe et des feuilles du grenadier (*Punica granatum* L.). Elle se structure autour de trois axes principaux : (1) une enquête ethnobotanique menée auprès des populations vivant dans plusieurs régions d'Algérie afin de dresser un inventaire des usages

traditionnels du grenadier, en particulier ceux liés à l'épicarpe et aux feuilles, incluant les méthodes de préparation, les modes d'administration ainsi que les effets secondaires perçus, dans une optique de sauvegarder un savoir ancestral risquant de disparaître ; (2) une analyse phytochimique approfondie basée sur des dosages spectrophotométriques des composés phénoliques totaux, flavonoïdes totaux et tanins des extraits aqueux, hydroalcooliques et obtenus par infusion — méthode la plus fréquemment citée lors de l'enquête ethnobotanique ; (3) une évaluation de la cytotoxicité et de la génotoxicité des mêmes extraits à l'aide du test modèle des racines d'*Allium cepa*, permettant de mesurer l'indice mitotique et l'indice des aberrations chromosomiques, outil reconnu pour sa sensibilité et sa fiabilité en toxicologie environnementale (Animasaun et al., 2024).

Cette recherche ambitionne donc de contribuer à la fois à la connaissance scientifique des potentialités biologiques de sous-produits végétaux négligés et à la valorisation durable de la biodiversité locale, tout en intégrant une dimension anthropologique essentielle pour la préservation du patrimoine ethnobotanique national. En fournissant des données empiriques solides sur l'épicarpe et les feuilles du grenadier, elle pourrait ouvrir la voie à des applications innovantes dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques ou agroalimentaires.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur *Punica granatum* L.

1.1. Nomenclature et classification botanique

Le grenadier, connu scientifiquement sous le nom de *Punica granatum* L., appartient à la famille des Lythraceae, bien qu'il ait longtemps été classé dans la famille des Punicaceae, aujourd'hui considérée comme un synonyme taxonomique (Mabberley, 2017). Le genre *Punica* comprend principalement deux espèces reconnues : *Punica granatum* L., l'espèce cultivée et la plus répandue, et *Punica protopunica* Balf. f., endémique de l'île Socotra. Le nom « *Punica* » dérive du latin « *punicus* », faisant référence à Carthage (signifiant 'cartaginois'), où la plante était largement cultivée durant l'Antiquité, tandis que « *granatum* » évoque la structure du fruit, riche en graines (Morton, 1987).

Sur le plan taxonomique, *Punica granatum* L. se situe dans l'ordre des Myrtales, au sein du clade des Rosidae. Les révisions phylogénétiques récentes, fondées sur des analyses moléculaires, ont confirmé son rattachement aux Lythraceae, une famille caractérisée par des fleurs à pétales tordus et un ovaire infère ou semi-infère (Graham et al., 2005). Cette classification est désormais acceptée par la communauté scientifique et reconnue par les principales bases de données botaniques telles que The Plant List (2023) et le World Flora Online (2024).

1.2. Description morphologique

Punica granatum L., communément appelé grenadier, est un arbuste ou petit arbre caduc, généralement haut de 2 à 6 mètres, à port buissonnant et à rameaux souvent épineux (Holland et al., 2009). L'écorce, de couleur gris-brun, tend à se fissurer avec l'âge, tandis que les jeunes rameaux présentent une teinte rougeâtre et une surface glabre (Kafkas et al., 2025).

Les feuilles sont simples, opposées ou parfois groupées en verticilles, de forme oblongue à lancéolée, mesurant typiquement de 3 à 8 cm de long et 1 à 2 cm de large. Elles sont coriaces, luisantes sur la face supérieure, et dotées d'un court pétiole (Benidir et al., 2022). Le limbe présente une marge entière et un apex obtus, la couleur variant du vert clair au vert foncé selon les conditions environnementales (World Agroforestry Centre, n.d.).

La floraison, qui s'étend du printemps à l'été, se caractérise par des fleurs solitaires ou groupées à l'extrémité des rameaux. Les fleurs, hermaphrodites et actinomorphes, sont de couleur rouge vif, parfois orangées ou blanches selon les cultivars. Le calice, composé de 5 à 7 sépales soudés, persiste sur le fruit et forme la couronne typique de la grenade. La corolle compte 5 à 7 pétales froissés, insérés à l'intérieur du calice, et de nombreuses étamines entourent un ovaire infère (Holland et al., 2009 ; Flora of North America Editorial Committee, n.d.).

Le fruit, appelé grenade, est une baie globuleuse de 5 à 12 cm de diamètre, à épicarpe coriace et épais, dont la couleur varie du jaune au rouge foncé à maturité. L'intérieur du fruit est subdivisé par des cloisons membraneuses translucides en plusieurs loges, chacune contenant de nombreuses graines anguleuses entourées d'un arille juteux et translucide à rouge, qui constitue la partie comestible (Kafkas et al., 2025). Le fruit conserve à son sommet la couronne formée par le calice persistant. Les graines, de 7 à 12 mm de long, sont dotées d'un tégument charnu et d'une forme anguleuse (Benidir et al., 2022).

Cette diversité morphologique, tant au niveau végétatif que reproducteur, explique la grande variabilité observée parmi les cultivars et écotypes de *Punica granatum* L., ce qui constitue un enjeu majeur pour la sélection et l'amélioration variétale.

1.3. Répartition géographique et adaptations écologiques

Punica granatum L. présente une large distribution géographique et des adaptations écologiques remarquables. Originaire d'Asie centrale, en particulier d'Iran et d'Afghanistan, elle s'est répandue dans diverses régions, notamment la Méditerranée, l'Asie, l'Amérique, l'Afrique et l'Europe, entraînant une importante diversité génétique (Shilpa et al., 2023). Son adaptabilité à diverses conditions climatiques et pédologiques en a fait une culture vitale dans les régions semi-arides et sèches, où elle prospère même sur des terres marginales (Hiwale, 2015).

Chapitre 2 : Ethnopharmacologie

2.1. Usages traditionnels des écorces et feuilles

Le grenadier (*Punica granatum* L.) occupe une place centrale dans la pharmacopée traditionnelle de nombreuses cultures, où diverses parties de la plante, en particulier les écorces

et les feuilles, sont utilisées pour traiter une variété d'affections. Les écorces du fruit et de la tige sont historiquement reconnues pour leurs propriétés astringentes et anthelminthiques. Elles sont fréquemment employées en décoction ou en poudre pour traiter la diarrhée, la dysenterie, les infections parasitaires intestinales (notamment les vers ronds et le ténia), ainsi que les hémorragies digestives et les maux de gorge (DeFilipps & Krupnick, 2018 ; Patel & Acharya, 2021 ; Maphetu et al., 2022). Dans la médecine traditionnelle chinoise, la Pharmacopée du peuple chinois mentionne l'utilisation de l'écorce pour ses effets antidiarrhéiques, hémostatiques et vermifuges (Wong et al., 2021).

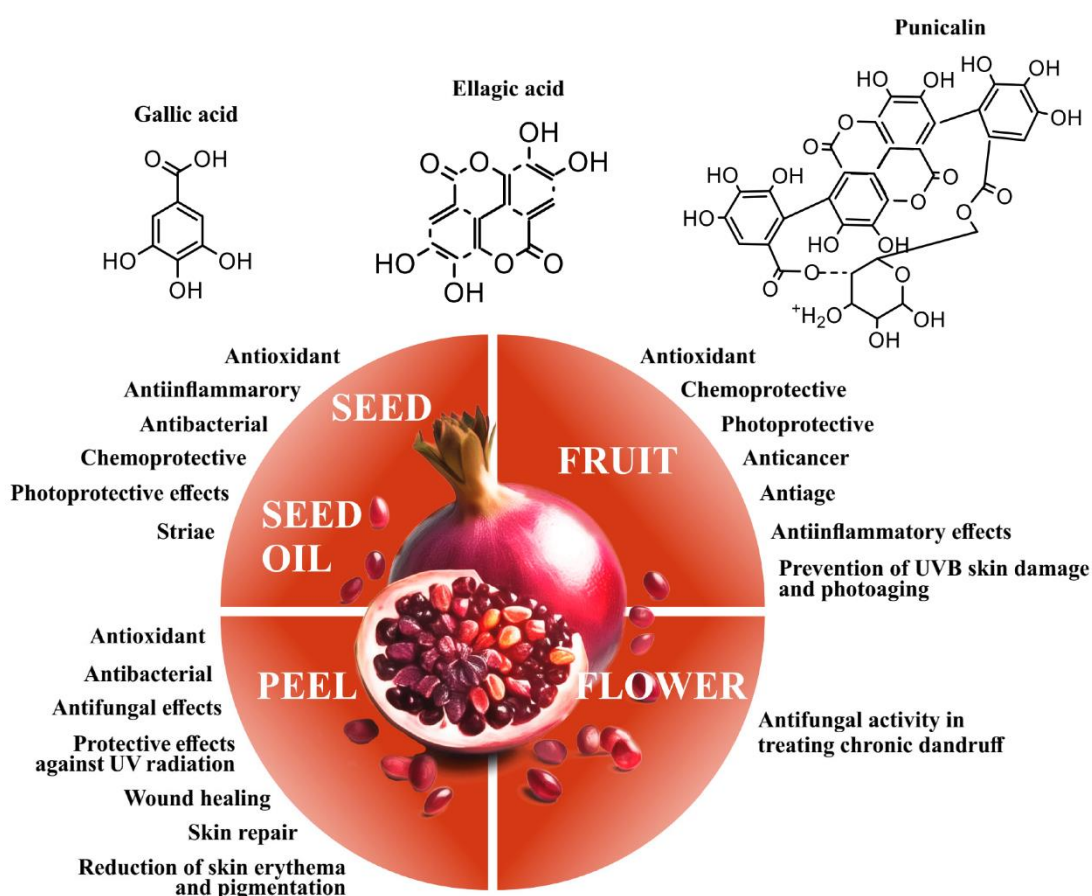


Figure 1. Propriétés pharmacologiques des différentes parties de *Punica granatum* et de ses principaux composés bioactifs. (Dimitrijevic et al., 2024)

Les feuilles de *Punica granatum* sont également valorisées en usage traditionnel, bien que de façon moins répandue que les écorces. Elles sont principalement utilisées en infusion ou en décoction pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antidiabétiques, et comme remède contre la toux, les maux de gorge, et les troubles digestifs mineurs (Machado et al., 2023 ; Patel & Acharya, 2021). Dans certaines régions d'Asie et du Moyen-Orient, une décoction de feuilles est administrée en gargarisme pour soulager les inflammations buccales et pharyngées, ou

appliquée localement pour traiter les démangeaisons et les affections cutanées (DeFilipps & Krupnick, 2018 ; Ali et al., 2017).

L'usage des écorces et des feuilles du grenadier est ainsi attesté dans de nombreuses traditions médicales, notamment en Inde, en Chine, au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et dans la région méditerranéenne, où ces organes sont réputés pour leur efficacité dans la gestion des troubles gastro-intestinaux, des infections parasitaires et des inflammations (Ali et al., 2017 ; Maphetu et al., 2022 ; Patel & Acharya, 2021). Toutefois, si de nombreuses indications traditionnelles sont aujourd'hui confirmées par des études pharmacologiques, d'autres restent à valider scientifiquement.

2.2. Autres usages (agroalimentaire, cosmétique, teintures naturelles)

Punica granatum L. occupe une place notable dans l'industrie agroalimentaire, la cosmétique et la fabrication de teintures naturelles, grâce à la richesse de ses composés bioactifs et à la polyvalence de ses différents organes, notamment les écorces, les graines et le jus. Dans le secteur agroalimentaire, le jus de grenade est largement consommé frais ou transformé en sirop, gelées, sorbets, confitures et boissons fermentées, telles que le vin de grenade, particulièrement apprécié dans certaines traditions méditerranéennes (Benidir et al., 2022). Les graines sont utilisées dans les salades, desserts et plats traditionnels, tandis que les extraits d'écorce sont exploités comme agents conservateurs naturels dans l'industrie de la viande, en raison de leur activité antimicrobienne et antioxydante qui prolonge la durée de conservation des produits carnés (Kanatt et al., 2010 ; Gonzalez et al., 2015).

Dans le domaine cosmétique, les extraits de grenade, riches en polyphénols, flavonoïdes et acides ellagiques, sont incorporés dans de nombreux produits de soin pour la peau et les cheveux. Ces extraits sont valorisés pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-âge, dépigmentantes et réparatrices, avec des effets démontrés sur la prévention du vieillissement cutané, la réduction des taches pigmentaires, l'amélioration de l'élasticité et de l'éclat de la peau, ainsi que la promotion de la cicatrisation (Parveen et al., 2022 ; Aslam et al., 2006). Des études cliniques récentes confirment la sécurité et l'efficacité des formulations à base d'extraits de grenade pour l'atténuation de l'hyperpigmentation et l'amélioration de la texture cutanée (Kanlayavattanakul et al., 2022).

Par ailleurs, les écorces de grenade sont traditionnellement utilisées comme source de colorants naturels pour la teinture des textiles et la coloration biologique. Les pigments extraits,

principalement des tanins et des anthocyanes, permettent d'obtenir une gamme de teintes allant du jaune au rouge-brun, avec une bonne affinité pour les fibres naturelles comme le coton et la laine (Elgubbi & Asayh, 2017). Les colorants issus de *Punica granatum* offrent une alternative écologique et biodégradable aux colorants synthétiques, avec un intérêt croissant pour l'industrie textile durable et la coloration de préparations cytogénétiques (Elgubbi & Asayh, 2017).

Enfin, la valorisation des coproduits issus de la transformation de la grenade, tels que les marcs et les écorces, s'inscrit dans une démarche d'économie circulaire, permettant leur utilisation comme sources de fibres alimentaires, d'antioxydants, d'agents texturants ou encore d'additifs fonctionnels dans divers secteurs industriels (Tavallali et al., 2020).

Chapitre 3 : Phytochimie

3.1. Principaux groupes de composés bioactifs présents dans *Punica granatum* L.

Punica granatum L. constitue une source exceptionnelle de composés bioactifs, dont la répartition varie significativement selon les organes végétaux. Les écorces et feuilles, particulièrement riches en métabolites secondaires, renferment des composés phénoliques dominés par les ellagitannins (dont la punicalagine, la punicaline et la pédunculagine), représentant jusqu'à 50% du poids sec des écorces (Sreekumar et al., 2014 ; Ismail et al., 2012). Ces polyphénols hydrolysables, caractérisés par leur structure ester de l'acide hexahydroxydiphénique, confèrent une puissante activité antioxydante et anti-inflammatoire (Fakudze et al., 2022).

Les flavonoïdes (catéchines, quercétine, kaempférol, lutéoline) et les anthocyanes (cyanidine-3-glucoside, delphinidine-3-glucoside) sont abondants dans les arilles et le jus, tandis que les écorces et feuilles concentrent des acides phénoliques (acide gallique, ellagique, chlorogénique) et des proanthocyanidines (Maphetu et al., 2022 ; Sreekumar et al., 2014). Les feuilles présentent également des alcaloïdes (pelletiérine), des triterpénoïdes (acide ursolique) et des stérols (daucostérol), contribuant à leurs propriétés antimicrobiennes et antidiabétiques (Bekir, 2013 ; Fakudze et al., 2022).

Les graines se distinguent par leur teneur élevée en acides gras conjugués, notamment l'acide punicoïque (oméga-5), représentant 65-80% des lipides totaux, ainsi qu'en tocophérols et

stéroïdes (Sreekumar et al., 2014 ; Fakudze et al., 2022). Enfin, toutes les parties de la plante contiennent des minéraux essentiels (potassium, calcium, magnésium, zinc) et des vitamines (ascorbate), synergisant avec les polyphénols pour moduler les voies biologiques (Nrf2, NF- κ B) (Maphetu et al., 2022).

2.3. Principales activités biologiques de *Punica granatum* L.

Les activités biologiques de *Punica granatum* L. sont étendues et diversifiées, principalement en raison de sa riche composition en composés bioactifs. Elle présente des activités biologiques importantes, notamment anticancéreuses, antioxydantes, antibactériennes, antivirales, hypoglycémiantes, hypolipidémiantes, cardioprotectrices et protectrices du système digestif, attribuées à ses riches composants phénoliques tels que les tanins hydrolysables, les flavonoïdes et les acides phénoliques (Grillo et al., 2023 ; Zhao et al., 2024).

Les feuilles de *Punica granatum* L. présentent des activités biologiques importantes, notamment des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antimétaboliques, anticancéreux et antimicrobiens. Ces activités sont principalement attribuées à la présence de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les tanins, l'acide ellagique et l'acide gallique (Machado et al., 2022).

2.4. Méthodes d'extraction et d'analyses phytochimiques

L'extraction et l'analyse des composés phytochimiques des extraits végétaux, entre autres *Punica granatum* L., reposent sur des techniques variées, adaptées à la nature des composés ciblés et à la matrice végétale étudiée. Les méthodes d'extraction sont cruciales pour optimiser le rendement et préserver l'intégrité des métabolites secondaires, notamment les polyphénols, flavonoïdes et tanins présents en abondance dans les écorces et les feuilles.

2.4.1. Méthodes d'extraction

La macération et la percolation avec des solvants polaires tels que le méthanol, l'éthanol, ou l'eau, sont les techniques les plus couramment utilisées pour l'extraction des composés phénoliques de *Punica granatum* (Sreekumar et al., 2014 ; Ismail et al., 2012). L'utilisation de mélanges hydro-alcooliques permet d'optimiser l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes, tandis que l'extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes améliore significativement le rendement et réduit le temps d'extraction (Mphahlele et al., 2016). Plus

récemment, des techniques innovantes telles que l'extraction assistée par ultrasons, la pressurisation hydrostatique et l'extraction par fluide supercritique ont été appliquées avec succès pour isoler des composés bioactifs à haute valeur ajoutée, tout en limitant la dégradation thermique des molécules sensibles (Mphahlele et al., 2016 ; Gullón et al., 2020).

2.4.2. Analyses phytochimiques

L'identification et la quantification des composés extraits reposent sur une combinaison de méthodes qualitatives et quantitatives. Le dosage des polyphénols totaux est généralement réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu, tandis que les flavonoïdes totaux sont déterminés par la méthode colorimétrique à l'aluminium trichlorure ($AlCl_3$) (Ismail et al., 2012 ; Gullón et al., 2020). Les tanins sont quantifiés par la méthode de vanilline ou par précipitation avec le chlorure ferrique.

Pour l'analyse structurale et la caractérisation fine des métabolites, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), couplée à la détection UV ou à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), est la méthode de référence. Elle permet d'identifier et de quantifier précisément les ellagitannins (punicalagine, punicaline), les acides phénoliques (acide ellagique, acide gallique) et les flavonoïdes (quercétine, kaempférol) présents dans les extraits de grenade (Sreekumar et al., 2014 ; Gullón et al., 2020). La chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) est également utilisée pour l'analyse des composés volatils et des acides gras, notamment dans les graines (Viuda-Martos et al., 2010).

Enfin, l'activité antioxydante des extraits est fréquemment évaluée par des tests *in vitro* tels que le DPPH, l'ABTS ou le FRAP, qui mesurent la capacité de piégeage des radicaux libres et le pouvoir réducteur des extraits (Mphahlele et al., 2016 ; Gullón et al., 2020).

Chapitre 4 : Cytotoxicité et génotoxicité

4.1. Cytotoxicité

4.1.1. Définition et utilité de la cytotoxicité

La cytotoxicité désigne la capacité d'un agent chimique, physique ou biologique à provoquer des dommages cellulaires pouvant entraîner la mort de la cellule, soit par nécrose (mort cellulaire accidentelle, rapide et non régulée), soit par apoptose (mort cellulaire

programmée, contrôlée et ordonnée) (Riss et al., 2016). Ces deux mécanismes se distinguent par des modifications morphologiques et biochimiques spécifiques, telles que la perte d'intégrité membranaire dans la nécrose, ou la condensation chromatique et la fragmentation de l'ADN dans l'apoptose (Elmore, 2007).

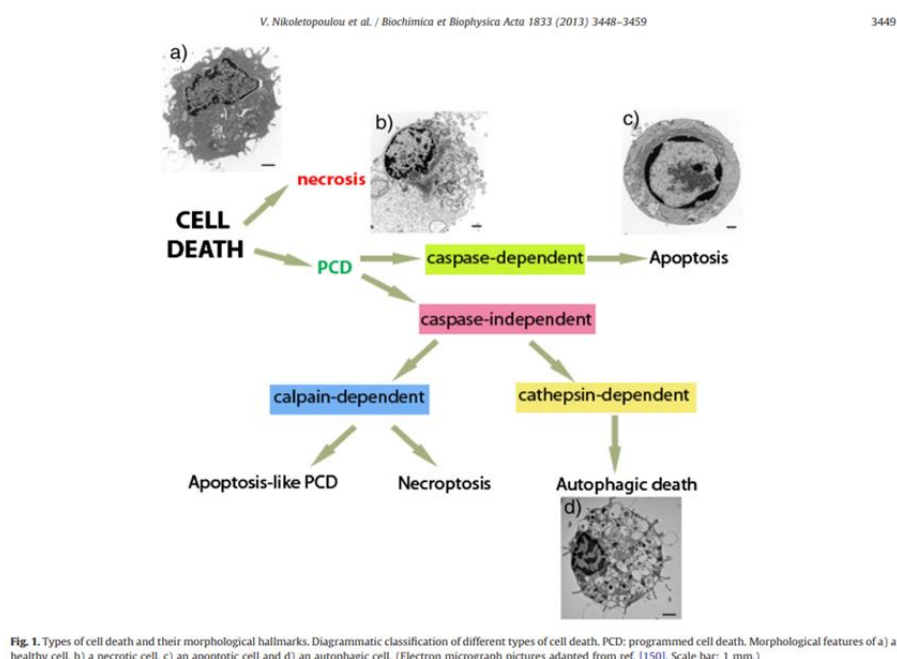


Fig.2. Types de mort cellulaire et leurs caractéristiques morphologiques (Nikolettou et al., 2013)

L'étude de la cytotoxicité est essentielle dans plusieurs domaines de la recherche biomédicale et pharmaceutique. Elle permet d'évaluer la sécurité et l'efficacité des composés candidats, notamment dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques anticancéreux. Ainsi, la cytotoxicité est un paramètre clé dans la sélection de molécules pour le développement de médicaments, car elle permet d'identifier les composés capables d'induire la mort cellulaire sélective des cellules tumorales tout en préservant les cellules saines (Riss et al., 2016). De plus, la cytotoxicité est étudiée dans le cadre de l'évaluation de la biocompatibilité des dispositifs médicaux, des cosmétiques et des produits agroalimentaires, afin de garantir l'innocuité de ces produits pour la santé humaine (Borenfreund & Puerner, 1985).

En résumé, la cytotoxicité est un concept central en biologie cellulaire et en pharmacologie, permettant d'appréhender les effets délétères des substances sur les cellules, d'optimiser les doses thérapeutiques et de limiter les effets secondaires indésirables.

4.1.2. Techniques d'étude de la cytotoxicité

Les méthodes d'évaluation de la cytotoxicité reposent sur des principes biologiques distincts et se classent en trois catégories principales selon leur mécanisme de détection :

A. Tests basés sur l'intégrité membranaire

- **Dosage du lactate déshydrogénase (LDH)** : Mesure la libération de LDH dans le milieu extracellulaire lors de la lyse cellulaire. La LDH catalyse la réduction du NAD^+ en NADH, générant un signal colorimétrique proportionnel à la cytotoxicité nécrotique (Riss et al., 2016).
- **Coloration au bleu trypan** : Exclusion du colorant par les cellules viables (membranes intactes), tandis que les cellules nécrotiques absorbent le colorant (Strober, 2015).

B. Tests basés sur l'activité métabolique

- **Réduction des sels de tétrazolium (MTT/XTT/MTS)** : Les cellules viables réduisent les sels en formazan, produisant un changement colorimétrique quantifiable. Le MTT est largement utilisé pour évaluer l'inhibition de la prolifération et la viabilité mitochondriale (Berridge & Tan, 1993).
- **Mesure de l'ATP** : Utilise la luciférase pour quantifier l'ATP intracellulaire via bioluminescence. Un déclin de l'ATP corrèle avec la perte de viabilité cellulaire (Crouch et al., 1993).

C. Tests basés sur la morphologie et la prolifération

- **Observation microscopique** : Évaluation qualitative des altérations morphologiques (arrondissement, vacuolisation) selon la norme ISO 10993-5 (Li et al., 2015).
- **Tests de prolifération** : Incorporation de thymidine tritiée ou de BrdU pour quantifier la synthèse d'ADN (Riss et al., 2016).

D. Méthodes spécialisées

- **Cytométrie en flux** : Combine l'iodure de propidium (nécrose) et l'annexine V (apoptose précoce) pour discriminer les mécanismes de mort cellulaire (Vermes et al., 1995).
- **Tests de contact direct/indirect (ISO 10993-5)** :
 - ✓ **Contact direct** : Évaluation des dispositifs médicaux solides en contact avec les cellules.
 - ✓ **Diffusion sur gélose** : Couche d'agar isolant les cellules des échantillons, idéale pour les matériaux libérant des composés solubles (Li et al., 2015).

Tableau 1 : Avantages et limites des méthodes d'évaluation de la cytotoxicité

Méthode	Avantages	Limitations
MTT	Haut débit, reproductibilité	Interférence avec les composés réducteurs
LDH	Détection spécifique de la nécrose	Sensibilité aux variations de pH/température
Cytométrie	Discrimination apoptose/nécrose	Coût élevé, complexité technique
Contact direct	Sensibilité optimale pour dispositifs médicaux	Inadapté aux matériaux flottants

4.1.3. Données des études antérieures sur la cytotoxicité du grenadier (*Punica granatum*)

De nombreuses études in vitro et in vivo ont démontré le potentiel cytotoxique des extraits de *Punica granatum* L. et de ses composés phénoliques contre différentes lignées cellulaires cancéreuses, tout en montrant une sélectivité vis-à-vis des cellules normales.

Par exemple, l'extrait éthanolique de *Punica granatum* var. *spinosa* a montré une inhibition dose-dépendante de la prolifération des cellules de cancer de la prostate (PC3), avec une IC₅₀ de 250,21 µg/mL, comparable à celle du paclitaxel. L'effet cytotoxique s'accompagne d'une induction de l'apoptose, confirmée par l'augmentation des nucléosomes (ELISA) et la fragmentation de l'ADN (TUNEL assay). Les cellules normales sont significativement moins affectées par les mêmes concentrations d'extrait, ce qui suggère une certaine sélectivité pour les cellules tumorales (Faria et al., 2012 ; Lansky & Newman, 2007).

Des études sur des lignées de cancer du sein (BT474, MDA-MB-231, MCF7) et de colon (HCT116, HT-29, LoVo) ont également mis en évidence une cytotoxicité concentration-dépendante des extraits polyphénoliques de grenade, sans effet délétère sur les fibroblastes mammaires non tumoraux (MCF-10F, MCF-12F). Cette cytotoxicité est associée à l'activation de la caspase-3 et à l'induction de l'apoptose, ainsi qu'à une inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire (Adhami et al., 2009 ; Mrđanović et al., 2020).

Concernant les feuilles, l'extrait aqueux a montré une inhibition de la prolifération des cellules de carcinome pulmonaire non à petites cellules (A549, H1299) par arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et induction de l'apoptose via la voie mitochondriale, sans toxicité notable pour les cellules normales (Wang et al., 2016).

Enfin, plusieurs travaux soulignent que les principaux composés responsables de l'activité cytotoxique sont les ellagitannins (notamment la punicalagine), les acides ellagique et gallique, ainsi que les anthocyanes, qui agissent en synergie pour induire l'apoptose, arrêter le cycle cellulaire et inhiber l'invasion tumorale (Seeram et al., 2005 ; Mrđanović et al., 2020 ; Shabani et al., 2023).

Chapitre 4 : Génotoxicité

4.1.4. Définition et utilité de la génotoxicité

La génotoxicité désigne la capacité d'un agent chimique, physique ou biologique à endommager le matériel génétique d'une cellule, c'est-à-dire l'ADN ou les chromosomes, entraînant des altérations structurales ou fonctionnelles du génome (Ahamed Noor Mansoori et al., 2014). Ces dommages peuvent se manifester sous forme de mutations géniques (additions, délétions, substitutions), de lésions primaires de l'ADN (adduits, pontages ADN-protéines, cassures simple ou double brin), de réarrangements chromosomiques (translocations, inversions) ou d'anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdie) (Saks et al., 2017).

La génotoxicité revêt une importance majeure en toxicologie, en pharmacologie et en santé publique, car elle constitue un mécanisme clé dans l'initiation de nombreuses maladies, notamment le cancer et les pathologies héréditaires (Phillips & Arlt, 2009). Les tests de génotoxicité sont essentiels pour l'identification précoce de substances potentiellement mutagènes ou cancérogènes, que ce soit dans le développement de nouveaux médicaments, l'évaluation de la sécurité des produits chimiques industriels, ou la surveillance de la contamination environnementale (Mahadevan et al., 2011). Ainsi, la génotoxicité est un critère réglementaire fondamental pour l'autorisation de mise sur le marché de nombreux produits et son évaluation permet de prévenir les risques de mutations transmissibles ou de transformations malignes des cellules somatiques (Saks et al., 2017).

4.1.5. Techniques d'étude de la génotoxicité

L'évaluation de la génotoxicité repose sur une batterie de tests standardisés, réglementés par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques OCDE et les agences internationales, permettant de détecter différents types de dommages génétiques selon des

mécanismes d'action spécifiques. Ces techniques se répartissent en tests in vitro, in vivo et en tests végétaux, chacun ciblant des paramètres génétiques distincts (Daniel, 2022).

3.2.2.1. Tests in vitro de base

D'après (Mahadevan et al., 2011 ; Saks et al., 2017), la batterie standard de tests in vitro comprend trois épreuves complémentaires recommandées par l'OCDE :

- **Le test de mutation réverse bactérienne** (Test d'Ames, OCDE TG 471) utilise des souches de *Salmonella typhimurium* déficientes en histidine pour détecter les mutations géniques ponctuelles.
- **Le test d'aberration chromosomique** (OCDE TG 473) évalue les agents clastogènes provoquant des cassures chromosomiques, des réarrangements et des translocations dans des cellules de mammifères en culture.
- **Le test micronoyau** (OCDE TG 487) détecte à la fois les effets clastogènes et aneugènes par comptage des micronoyaux formés lors de la division cellulaire.

3.2.2.2. Tests in vivo complémentaires

Phillips & Arlt, (2009) rapportent que les tests in vivo sont requis lorsque les résultats in vitro sont positifs ou équivoques. Le test micronoyau des érythrocytes de mammifères (OCDE TG 474) constitue l'épreuve in vivo la plus largement utilisée, réalisable sur moelle osseuse ou sang périphérique. Le test d'aberration chromosomique in vivo (OCDE TG 475) analyse les anomalies chromosomiques dans la moelle osseuse de mammifères exposés, tandis que le test de la comète in vivo (OCDE TG 488) détecte les cassures simples et double brin de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.2.2.3. Test des racines d'oignon (*Allium cepa*)

Le test d'*Allium cepa* constitue un système d'évaluation végétal largement reconnu et validé pour l'étude de la génotoxicité (Banti & Hadjikakou, 2019). *Allium cepa* L. ($2n = 16$) représente, selon les mêmes auteurs, un système de test très pratique pour estimer les effets délétères des substances chimiques sur le matériel biologique. Ce test est efficace pour le criblage chimique et la surveillance in situ des effets génotoxiques des contaminants environnementaux, montrant une sensibilité supérieure à d'autres tests pour détecter la toxicité et la génotoxicité (Leme & Marin-Morales, 2008).

Le protocole standard comprend l'exposition des racines d'*Allium cepa* à différentes concentrations de la substance testée pendant 24 à 48 heures. L'évaluation porte sur plusieurs paramètres : l'index mitotique (pourcentage de cellules en division), les aberrations chromosomiques (fragments, ponts, chromosomes vagabonds, C-anaphases, multipolarité, chromosomes collants), les anomalies nucléaires et la présence de micronoyaux (Vellaikkannu et al., 2017; Banti & Hadjikakou, 2019). Ce test présente l'avantage de détecter une grande variété d'effets génotoxiques, notamment les mutations ponctuelles et les altérations chromosomiques, tout en étant relativement simple et économique à réaliser.

3.2.2.4. Techniques spécialisées

- **Le test de la comète (Comet assay) :** constitue une technique d'électrophorèse particulièrement sensible pour mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique et indirectement lors des processus de réparation de l'ADN ou de l'apoptose (Collins & Azqueta, 2012).
- **Le test des échanges entre chromatides sœurs (ECS) :** est un outil essentiel pour évaluer les réarrangements intra-chromosomiques de l'ADN, car il sert de biomarqueur sensible de l'exposition à des agents génotoxiques. Ce test mesure la fréquence des échanges entre les chromatides sœurs au cours de la réplication de l'ADN, ce qui peut indiquer l'étendue des dommages à l'ADN et l'efficacité des mécanismes de réparation (Wójcik & Smalec, 2010).

Ces techniques sont souvent combinées en batteries pour couvrir un large spectre d'effets génotoxiques et améliorer la fiabilité des résultats, chaque test présentant une spécificité pour certaines familles chimiques de génotoxines.

4.1.6. Données des études antérieures sur la génotoxicité du grenadier (*Punica granatum*)

Les études sur la génotoxicité de *Punica granatum* L. révèlent des résultats apparemment contradictoires, suggérant que les effets dépendent étroitement du type d'extrait, des organes végétaux utilisés, des concentrations testées et des méthodologies d'évaluation employées.

3.2.3.1. Effets génotoxiques démontrés

L'étude de Sánchez-Lamar et al. (2008) a démontré que l'extrait hydroalcoolique du fruit entier présente des propriétés génotoxiques significatives, détectées par plusieurs méthodes complémentaires.

3.2.3.2. Effets protecteurs et absence de génotoxicité directe

A l'inverse, l'étude de Teixeira et al. (2017) utilisant le système test *Allium cepa* sur l'extrait aqueux de l'épicarpe de grenade, révèle une absence d'effets génotoxiques directs et même un potentiel effet protecteur. Cette étude démontre que l'extrait aqueux de l'épicarpe n'induit pas de dommages directs à l'ADN aux concentrations testées (10, 20, 40 et 80 mg/mL). Cependant, à la concentration maximale de 80 mg/mL, les auteurs observent des effets cytotoxiques caractérisés par la présence de vacuoles cytoplasmiques, d'anomalies de formation du fuseau mitotique, de C-métaphases et de cellules binucléées, suggérant des effets aneugènes pouvant conduire indirectement à des altérations chromosomiques quantitatives.

4.2.3.3. Les aberrations chromosomiques et instabilité du cycle cellulaire

Les aberrations du cycle cellulaire peuvent entraîner des défauts majeurs dans la ségrégation des chromosomes, contribuant ainsi à une instabilité génétique profonde, souvent observée dans les cellules cancéreuses. Parmi les anomalies les plus caractéristiques, on retrouve les ponts de chromatides sœurs, issus de cassures d'ADN mal réparées ou de fusions de télomères. Observés en anaphase, ces ponts gênent la séparation correcte des chromatides et entraînent des ruptures chromosomiques au moment de la cytokinèse (Bizard & Hickson, 2018). Ce phénomène peut conduire à l'apparition de micronoyaux, petites structures nucléaires contenant des fragments chromosomiques ou des chromosomes entiers exclus du noyau principal lors de la division. (Kwon et al., 2020) Les micronoyaux sont non seulement un marqueur d'instabilité génétique, mais peuvent aussi déclencher une réponse immunitaire via le complexe cGAS-STING, jouant ainsi un rôle double dans la tumorigenèse (Guscott et al., 2022).

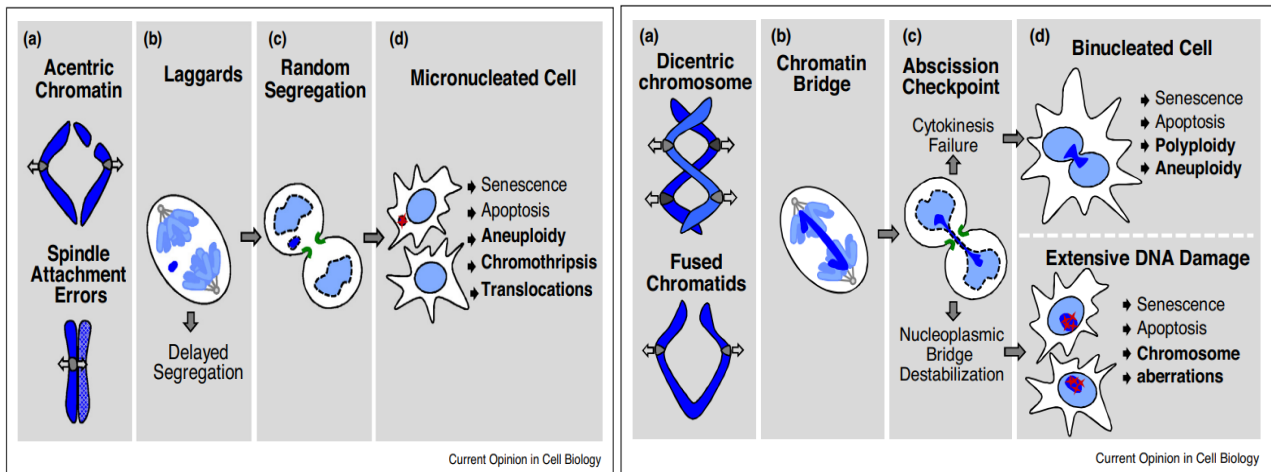


Fig. 3. Impact des ponts de chromosomique, et chromosome retardataire sur la division cellulaire et la stabilité génomique (Bizard & Hickson, 2018)

Chapitre 5 : Limites des connaissances actuelles

Malgré l'accumulation substantielle de données précliniques, plusieurs lacunes critiques persistent dans la compréhension des propriétés de *P. granatum*. Ses parties non-fructifères (feuilles et écorces), disponibles comme sous-produits de la culture restent peu documentés scientifiquement en Algérie.

Méthodologie

Méthodologie

1. Méthodologie de l'étude :

Notre étude ethnopharmacologique s'est déroulée en quatre étapes principales. Elle a été réalisée dans différentes régions d'Algérie, notamment Alger, Mostaganem, Tizi Ouzou et notre wilaya de Tiaret. Cette diversité géographique nous a permis de recueillir des données représentatives des pratiques locales. L'enquête s'est étendue de février à juin 2025. Durant cette période, nous avons interrogé 138 participants, composés d'herboristes, de médecins et de personnes ordinaires. La collecte d'informations s'est effectuée à l'aide d'un questionnaire structuré. Celui-ci comprenait deux volets principaux. Le premier concernait les données sociodémographiques telles que l'âge, le sexe, le niveau d'éducation et la profession. Le second volet portait sur les usages traditionnels du grenadier. Nous avons ainsi recensé les méthodes de préparation utilisées, telles que la décoction et l'infusion. Les effets secondaires rapportés ont également été notés. Toutes les données recueillies ont ensuite été organisées dans un fichier Excel afin d'en faciliter le traitement et l'analyse statistique. Cette démarche a permis de structurer efficacement les résultats obtenus.

1.2. Préparation d'extraits de plantes

Dans le cadre de cette étude, la poudre de l'écorce de grenade et les feuilles (*Punica granatum L*) a été acquise prête à l'emploi auprès de commerces spécialisés situés dans la ville de Tiaret (Algérie). Les feuilles de grenade, quant à elles, ont été achetées dans la même région, puis séchées à l'air libre et finement broyées jusqu'à obtention d'une poudre homogène, utilisée pour les analyses ultérieures.

La méthode de préparation est identique pour les deux organes, à savoir les écorces et les feuilles

L'extrait aqueux a été préparé par macération de 50 g de poudre végétale dans 500 mL d'eau distillée, dans un ballon en verre. Le mélange a été agité à température ambiante, à l'obscurité, pendant 24 heures. Après macération, la solution a été filtrée à l'aide d'un papier

filtre . Le filtrat obtenu a ensuite été déshydraté dans un cristalliseur, puis placé dans une étuve à 37 °C jusqu'à obtention d'un résidu sec, lequel a été conservé dans une boîte propre, à l'abri de l'humidité.

L'extrait éthanolique a été préparé en introduisant 50g de poudre végétale dans un ballon en verre contenant 500 mL d'éthanol à 70 %. Le mélange a été agité pendant 24 heures, puis laissé en macération pendant 24 heures. Après cette période, la solution a été filtrée à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat obtenu a ensuite été déshydraté dans un cristalliseur, puis placé dans une étuve à 37 °C jusqu'à obtention d'un résidu sec, lequel a été conservé dans une boîte propre, à l'abri de l'humidité.

Les extraits des deux plantes ont été préparés fraîchement par infusion dans l'eau à différentes concentrations (2,5 ; 5 ; 10 ; 20 mg/mL) pendant une durée de dix minutes. Par la suite, ils ont été utilisés dans le test *Allium cepa*.

Le rendement d'extraction correspond au rapport entre la quantité d'analyte extrait et la quantité de matière végétale utilisée. Il est calculé selon la formule suivante
$$\text{Rendement (\%)} = (\text{Poids de l'extrait sec} \times 100) / \text{Poids initial de la plante sèche}$$

1.3. Composés phytochimiques

1.3.1. Polyphénols

La quantification des composés phénoliques totaux a été réalisée selon la méthode de Folin-Ciocalteu, avec quelques modifications. À l'aide d'une micropipette, un volume de 200 µL de chaque extrait (aqueux et éthanolique), préparé aux concentrations de 0,1 ; 0,5 ; 0,75 et 1 mg/mL, a été transféré dans des tubes Eppendorf. À chaque tube, 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué au dixième a été ajouté. Les tubes ont ensuite été protégés de la lumière et incubés à température ambiante pendant 5 minutes. Par la suite, 800 µL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % ont été ajoutés à chaque tube. Après agitation

douce, les tubes ont été laissés à reposer à température ambiante pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

L'absorbance des mélanges réactionnels a été mesurée à une longueur d'onde de 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur totale en polyphénols a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie à l'aide de l'acide gallique comme standard. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique (mg EAG)/mL d'extrait. Chaque analyse a été réalisée en trois répétitions afin de garantir la fiabilité des résultats.

1.3.2 Flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium. Pour ce faire, 1 mL de chaque extrait (aqueux et éthanolique) a été transféré dans un tube Eppendorf, puis mélangé à 1 mL d'une solution de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 2 % préparée dans le méthanol. Le mélange a été vigoureusement agité à l'aide d'un vortex afin d'assurer une homogénéité optimale, puis incubé à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.

À l'issue de l'incubation, l'absorbance des solutions a été mesurée immédiatement à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant de l'eau distillée comme blanc. La quantification des flavonoïdes totaux a été réalisée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine comme standard. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents de quercétine (mg EQ)/mL d'extrait. Chaque analyse a été réalisée en trois répétitions afin de garantir la fiabilité des résultats.

1.3.3 tanins

La quantification des tannins totaux a été réalisée selon la méthode colorimétrique à la vanilline. Pour cela, un volume de 50 μ L de chaque extrait a été introduit dans un tube Eppendorf contenant 1500 μ L d'une solution de vanilline à 49 % préparée dans le méthanol. Le mélange a été vigoureusement agité à l'aide d'un vortex afin d'assurer une homogénéisation complète. Ensuite, 750 μ L d'acide chlorhydrique (HCl) concentré ont été ajoutés au mélange réactionnel. Ce dernier a été incubé à température ambiante pendant 20 minutes, à l'abri de la lumière.

À l'issue de la réaction, l'absorbance a été mesurée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant un blanc approprié (méthanol + réactifs sans extrait). La teneur totale en tannins a

été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine comme composé de référence. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents de quercétine (mg EQ)/mL d'extrait, . Chaque analyse a été réalisée en trois répétitions afin de garantir la fiabilité des résultats.

1.4. Analyse de l'indice mitotique

La plante d'oignon, *Allium cepa* ($2n = 16$), appartient à la famille des Alliaceae. Des bulbes d'oignon ont été achetés sur le marché local de Tiaret (Algérie), sélectionnés selon leur taille, puis nettoyés à l'eau distillée après élimination des racines et de la première pelure. Avant de procéder au test *Allium* anaphase-télophase, les écailles externes des bulbes ainsi que la plaque basale sèche ont été retirées avec précaution afin de ne pas endommager les primordia racinaires. Après 2 jours de germination dans l'obscurité à une température de 22 ± 4 °C, seuls les bulbes dont les racines mesuraient entre 1 et 2 cm ont été utilisés pour cette étude. Chaque bulbe germé a été placé dans un tube à essai contenant de l'eau distillée de manière à immerger uniquement les racines.

Par la suite, les cinq bulbes présentant la meilleure croissance ont été exposés pendant 48 heures à différentes concentrations aqueuses et éthanoliques d'extraits de *Punica granatum* L. Les concentrations choisies dans cette étude correspondent à celles identifiées lors de nos précédents travaux ethnopharmacologiques portant sur l'utilisation traditionnelle de *Punica granatum* L. en Algérie. L'eau distillée a été utilisée comme contrôle négatif, tandis que le méthyl méthane sulfonate a été employé comme contrôle positif.

Après 48 heures d'exposition dans l'obscurité, les 2 derniers centimètres des racines ont été prélevés, fixés dans la solution de Carnoy à 4 °C pendant au moins une nuit, puis conservés à long terme dans de l'éthanol à 70 %. Les racines ont ensuite été hydrolysées dans une solution d'HCl puis colorées au réactif de Fuchine à l'abri de la lumière.

Figure 4. Procédures du test *Allium cepa*



Pour chaque lame préparée, un comptage d'au moins 500 à 1000 cellules a été effectué afin d'assurer une représentativité statistique suffisante. L'analyse cytologique a permis de calculer l'indice mitotique (IM), défini comme le rapport du nombre de cellules en mitose au nombre total de cellules observées, multiplié par 100. Cet indice constitue un indicateur de l'activité proliférative et permet d'évaluer l'effet cytotoxique potentiel de la substance testée. Par ailleurs, l'observation microscopique a porté sur l'identification d'anomalies chromosomiques telles que les ponts chromosomiques, les fragments acentriques, les vésicules nucléaires et les micronoyaux, indicateurs de génotoxicité. Des perturbations du cycle cellulaire, telles que des retards de mitose ou un arrêt de division, ont également été prises en compte pour évaluer la toxicité globale des échantillons.

L'**indice de phase (IP)** est obtenu en divisant le nombre de cellules dans une phase spécifique par le nombre total de cellules en division, puis en multipliant le résultat par 100 :

$$\text{IP (\%)} = (\text{Nombre de cellules dans une phase spécifique} / \text{Nombre total de cellules en division}) \times 100$$

L'**indice d'aberrations chromosomiques (AC)** est déterminé en divisant le nombre de cellules aberrantes par le nombre total de cellules observées, puis en multipliant par 100 :

$$\text{AC (\%)} = (\text{Nombre de cellules aberrantes} / \text{Nombre total de cellules comptées}) \times 100$$

Résultats

1. Étude ethnopharmacologie

1.1. Étude de la répartition par l'âge

Les résultats de la caractérisation des personnes enquêtées montrent une répartition inégale selon l'âge. Cette distribution traduit une surreprésentation relative des individus âgés de 25 à 50 ans, appartenant vraisemblablement à la catégorie des personnes actives (Figure 5).

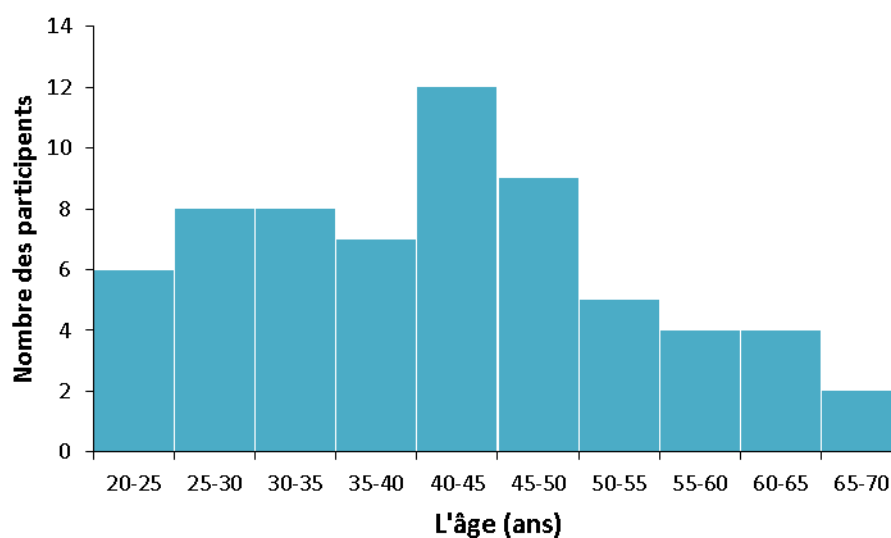


Figure . 5 . La répartition par âge des participants.

La tranche d'âge 40–45 ans est la plus représentée avec un effectif de douze participants. Elle est suivie, de manière relativement proche, par les tranches 25–30, 30–35 et 45–50 ans qui présentent des nombres similaires et stables. En revanche, à partir de la tranche 50–55 ans, on observe une diminution progressive du nombre de participants, particulièrement marquée dans les groupes d'âge supérieurs (55–60, 60–65 et 65–70 ans).

1.2. Étude de la répartition selon le sexe

Les résultats de la caractérisation des personnes enquêtées montrent une répartition inégale selon le sexe. Cette distribution traduit une surreprésentation marquée des hommes, qui représentent 90,58 % des participants. En revanche, les femmes sont sous-représentées avec un pourcentage de 9,42 % (Figure 6).

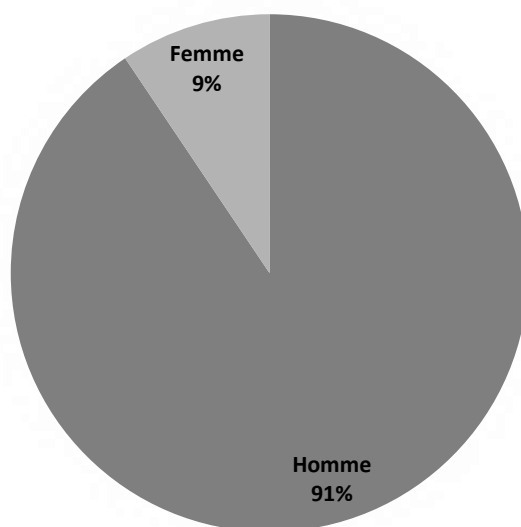


Figure. 6 . La répartition des participants selon le sexe

1.3. Étude de la répartition selon le niveau de vie

Les résultats de la caractérisation des personnes enquêtées montrent une répartition selon le niveau d'étude. Cette distribution indique que les participants ayant suivi un niveau d'étude secondaire sont les plus nombreux, avec 14 individus (Figure 7).

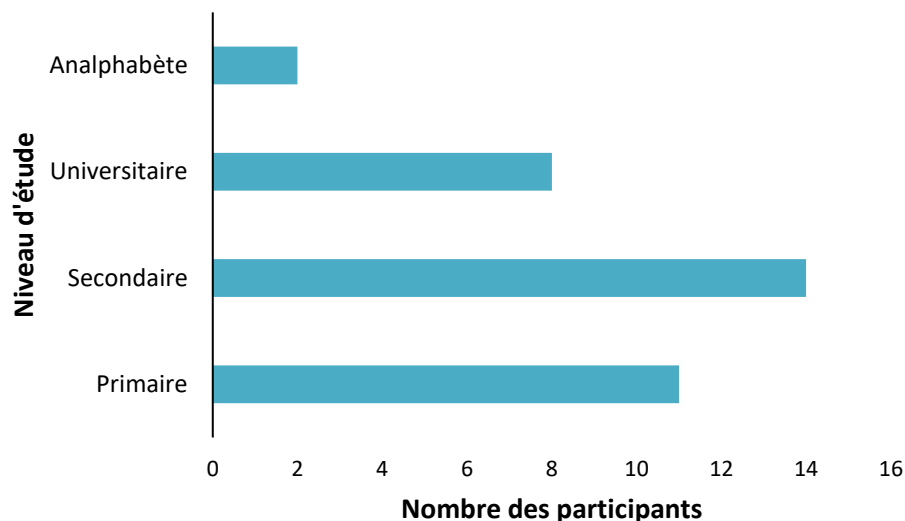


Figure. 7 . La répartition des participants selon le niveau d'études

Les participants ayant un niveau d'étude primaire représentent la deuxième catégorie la plus importante, avec 11 individus. En revanche, les participants ayant un niveau universitaire sont moins nombreux, avec 8 individus. Une faible proportion de participants est analphabète, comptabilisant seulement 2 individus.

1.4. Répartition des participants selon la fonction

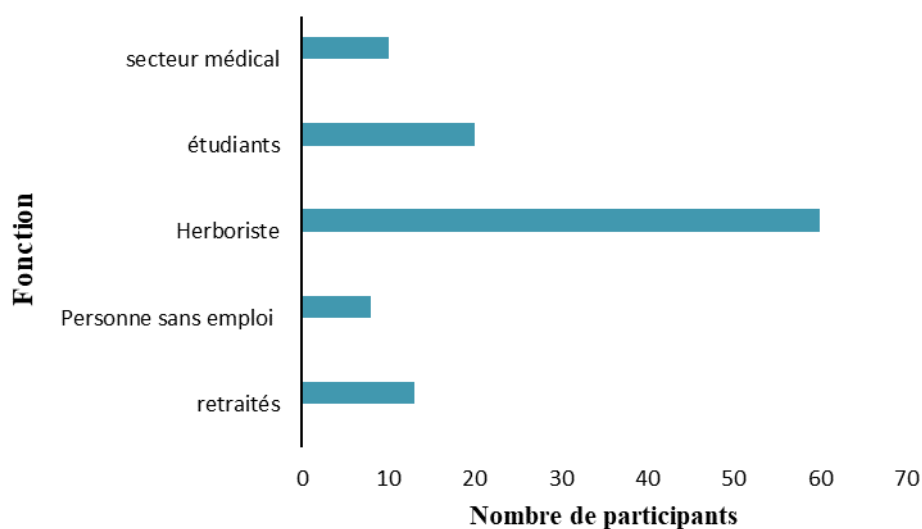


Figure 8. Répartition des participants selon la fonction

Le graphique montre que les herboristes constituent la majorité des participants à l'enquête ethnopharmacologique sur *Punica granatum L.*, avec près de 60 personnes. Les étudiants suivent avec près de 20 participants. Les retraités et les professionnels du secteur médical sont représentés chacun par environ 10 participants. Les personnes sans emploi constituent la catégorie la moins représentée avec moins de 10 participants.

1.5. Étude de la répartition selon l'utilisation

On observe que les usages les plus fréquemment cités pour le grenadier sont utiliser pour les inflammation en général (avec 20 participants), l'amélioration de la digestion (14 participants), et l'action pour stopper la diarrhée (16 participants). Le traitement des maux de gorge (10 participants) et l'utilité pour le côlon sont également des applications notables. En revanche, des usages comme les plaies d'estomac, l'effet anti-inflammatoire général, les brûlures ou les hémorragies internes sont beaucoup moins souvent mentionnés par les participants.

1.6. Fréquences de modes de préparation

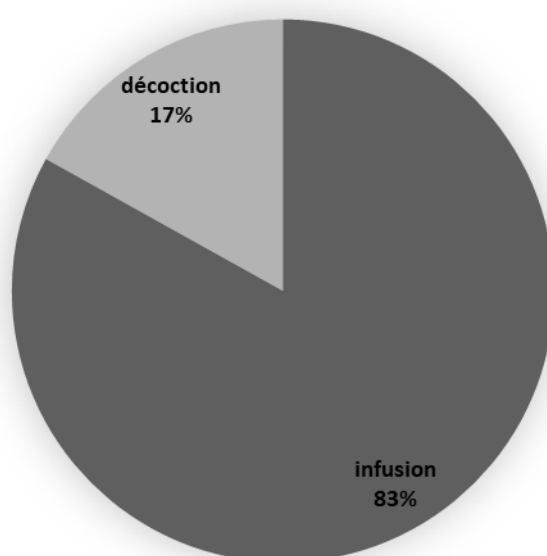


Figure 10. Fréquences de modes de préparation

Le graphique illustre les modes de préparation de *Punica granatum L.*, avec une nette prédominance de l'infusion utilisée dans 83 % des cas, contre seulement 17 % pour la décoction.

1.7. Étude de la répartition selon les personnes pour qui l'usage est déconseillé

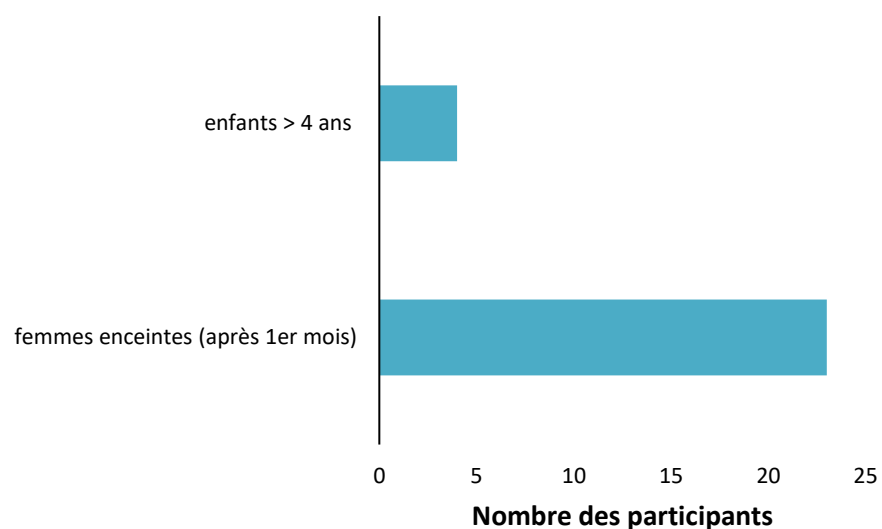


Figure. 11. La répartition des participants selon les personnes pour qui l'usage est déconseillé

2. Évaluation du rendement d'extraction

Le rendement de l'extrait éthanolique des écorces de grenadier était supérieur à celui de l'extrait aqueux. Les valeurs enregistrées sont les suivantes 24.76 % et 19.64 %

Tableau 2. Rendement des extraits des écorces

Extrait	Rendement
Extrait éthanolique	24.76 %
Extrait aqueux	19.64 %

Aussi le rendement de l'extrait éthanolique des feuilles de grenadier était supérieur à celui de l'extrait aqueux. Les valeurs enregistrées sont les suivantes 20.90 % et 10.41 %

Tableau 3. Rendement des extraits des feuilles

Extrait	Rendement
Extrait éthanolique	20.90 %
Extrait aqueux	10.41 %

3. Évaluation des composés phytochimiques pour les écorces

3.1.1. Teneur totale en composés phénoliques (les écorces)

L'examen des données révèle une différence notable dans la teneur totale en composés phénoliques entre les extraits de plantes aqueux et éthanoliques aux différentes concentrations étudiées. (Fig. 12)

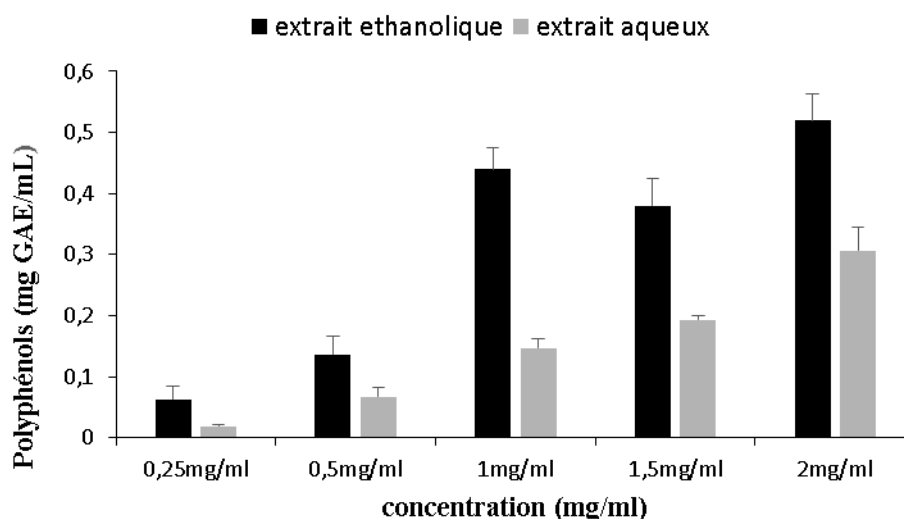


Fig. 12. Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits aqueux et éthanoliques de *Punica granatum L.*

la concentration de polyphénols augmente avec la concentration de l'extrait, tant pour l'éthanolique que pour l'aqueux. L'extrait éthanolique affiche constamment des niveaux de polyphénols plus élevés que l'extrait aqueux, avec son pic à 2 mg/mL atteignant environ 0,52 mg GAE/mL, tandis que l'extrait aqueux culmine à environ 0,3 mg GAE/mL. Les concentrations les plus faibles pour les deux extraits sont observées à 0,25 mg/mL.

3.1.2. Teneur totale en composés phénoliques (pour l'infusion)

Effet de la concentration sur la teneur en polyphénols (exprimée en mg GAE/mL) dans une infusion d'écorces (Fig. 13).

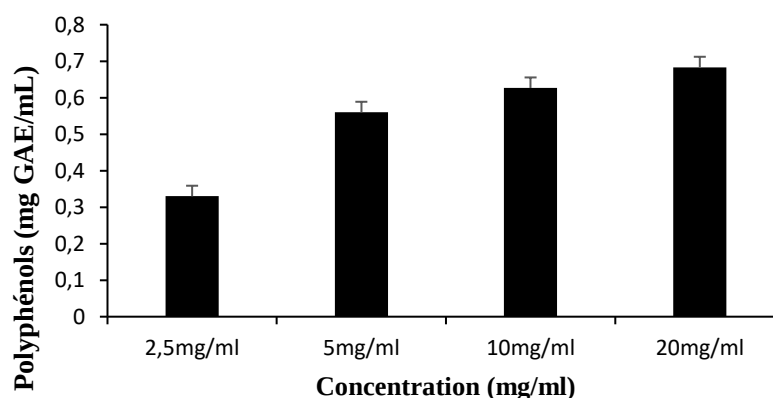


Fig. 13. Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits d'infusion des écorces de *Punica granatum L.*

Ce graphique montre que la teneur en polyphénols des écorces (infusion) augmente progressivement avec la concentration de l'extrait. On observe une élévation notable de 0,35 mg EAG/mL à 2,5 mg/mL jusqu'à environ 0,7 mg EAG/mL à 20 mg/mL.

3.1.4. Teneur totale en flavonoïdes (les écorces)

L'analyse des données révèle une différence notable dans la teneur en flavonoïdes entre les extraits aqueux et éthanoliques de la plante (Fig. 14).

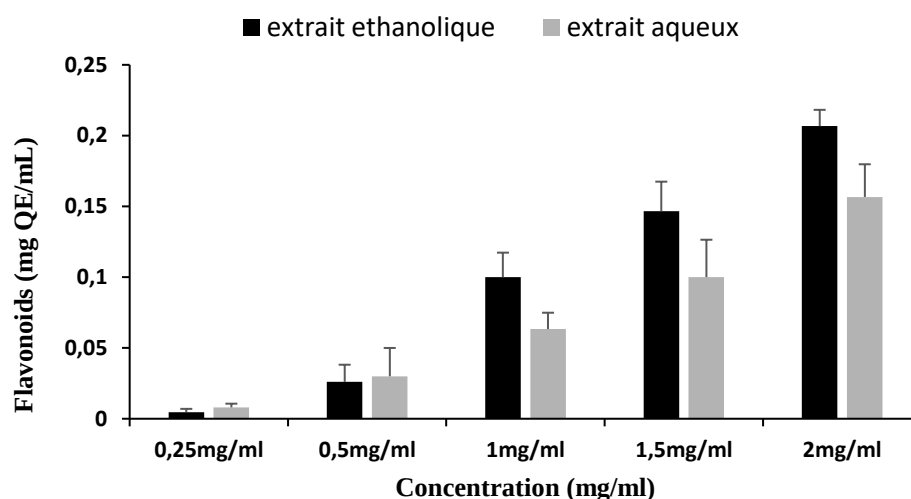


Fig. 14. Variation de la teneur en flavonoïdes dans les extraits aqueux et éthanoliques de *Punica granatum L.*

On observe que, pour toutes les concentrations testées, l'extrait éthanolique présente une teneur en flavonoïdes supérieure à celle de l'extrait aqueux. Cette différence devient plus marquée à mesure que la concentration augmente. Par exemple, à la concentration la plus élevée (2 mg/mL), la teneur en flavonoïdes atteint environ 0,2 mg QE/mL pour l'extrait éthanolique, contre environ 0,13 mg QE/mL pour l'extrait aqueux.

3.1.5. Teneur totale en flavonoïdes (pour l'infusion)

L'analyse des données révèle une différence notable dans la teneur en flavonoïdes pour l'infusion des écorces de la plante. (Fig. 15)

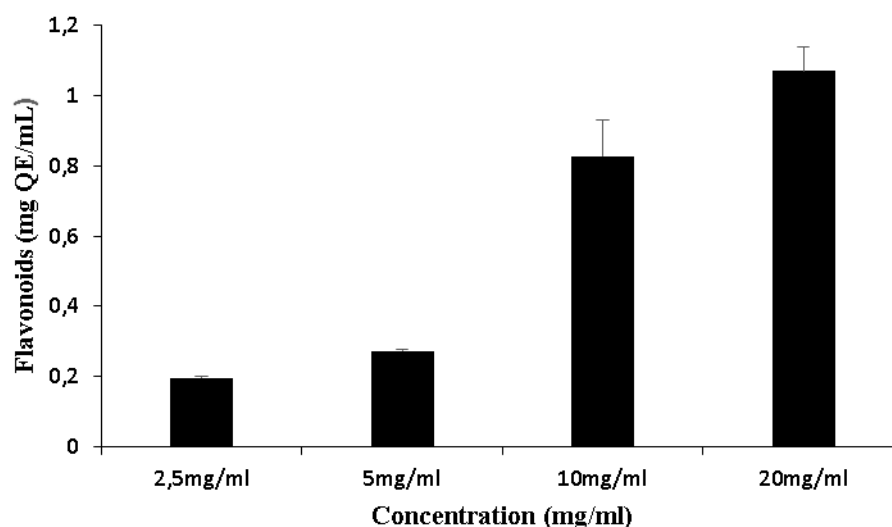


Fig. 15. Variation de la teneur totale en composés flavonoïdes dans les extraits d'infusion des écorces de *Punica granatum L.*

On observe une augmentation progressive et marquée de la teneur en flavonoïdes avec l'augmentation de la concentration. À la plus faible concentration (2,5 mg/mL), la teneur est d'environ 0,2 mg QE/mL, tandis qu'à la concentration la plus élevée (20 mg/mL), elle atteint un peu plus de 1 mg QE/mL. Cette évolution indique une relation dose-dépendante : plus la concentration de l'extrait est élevée, plus la quantité de flavonoïdes extraite est importante.

3.1.6. Teneur totale en tanins (les écorces)

L'analyse des données révèle une différence notable dans la teneur en tanins entre les extraits aqueux et éthanoliques de la plante. (Fig. 16)

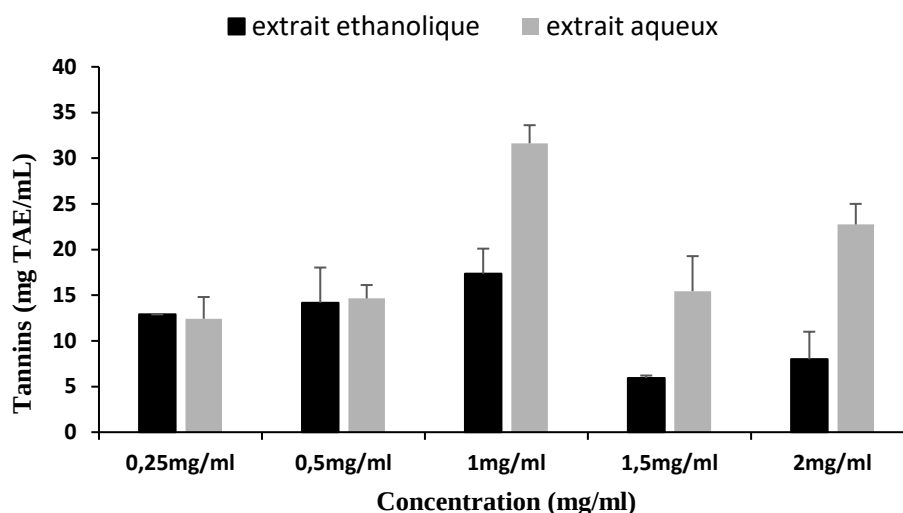


Fig. 16. Variation de la teneur totale en tanins dans les extraits aqueux et éthanoliques des écorces de *Punica granatum L.*

On remarque que, pour la plupart des concentrations, l'extrait aqueux présente une teneur en tanins supérieure à celle de l'extrait éthanolique. Cette différence est particulièrement marquée à 1 mg/mL et 2 mg/mL, où l'extrait aqueux atteint respectivement environ 32 mg TAE/mL et 23 mg TAE/mL, contre environ 18 mg TAE/mL et 10 mg TAE/mL pour l'extrait éthanolique. À 1,5 mg/mL, l'extrait aqueux conserve une teneur en tanins nettement plus élevée, tandis que l'extrait éthanolique affiche une valeur minimale.

3.1.7. Teneur totale en tanins (pour l'infusion)

L'analyse des données révèle une différence notable dans la teneur en tanins pour l'infusion des écorces de la plante. (Fig. 17)

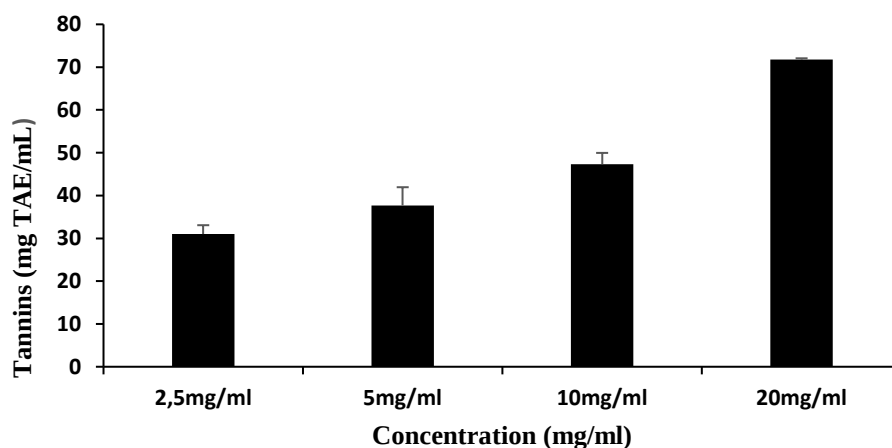


Fig. 17. Variation de la teneur totale en tanins dans les extraits d'infusion des écorces de *Punica granatum L.*

La teneur en tanins des infusions d'écorces de grenadier augmente progressivement de 20 à 70 mg TAE/mL lorsque la concentration passe de 2,5 à 20 mg/mL. Cette croissance dose-dépendante révèle une extraction efficace des polyphénols.

3. 2. Évaluation des composés phytochimiques pour les feuilles

3. 2.1. Teneur totale en composés phénoliques (les feuilles)

L'examen des données révèle une différence notable dans la teneur totale en composés phénoliques entre les extraits de plantes aqueux et éthanoliques aux différentes concentrations étudiées. (Fig. 18)

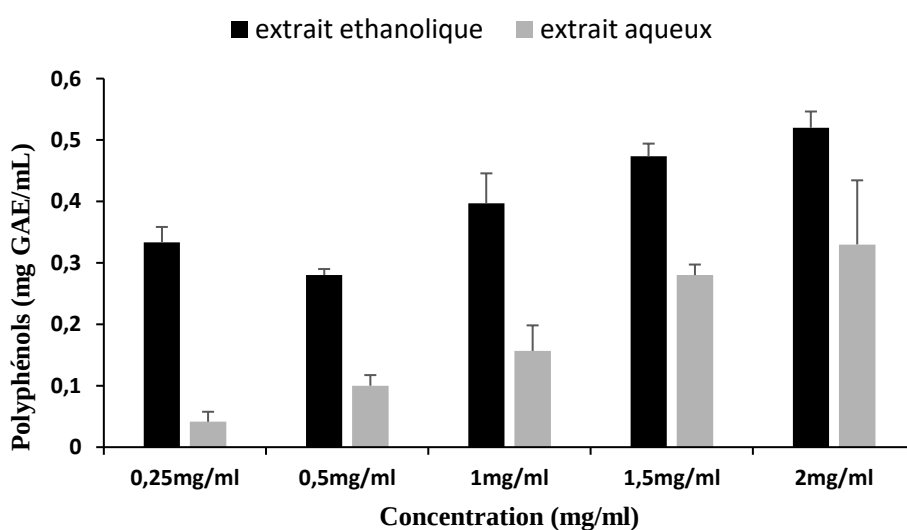


Fig. 18. Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de *Punica granatum L.*

Les extraits éthanoliques de feuilles montrent des teneurs en polyphénols plus élevées que les aqueux à toutes concentrations testées (0,25-2 mg/mL). La quantité de polyphénols augmente avec la concentration

3. 2. 2. Teneur totale en composés phénoliques (pour l'infusion)

Effet de la concentration sur la teneur en polyphénols (exprimée en mg CAE/mL) dans une infusion d'écorces. (Fig. 19)

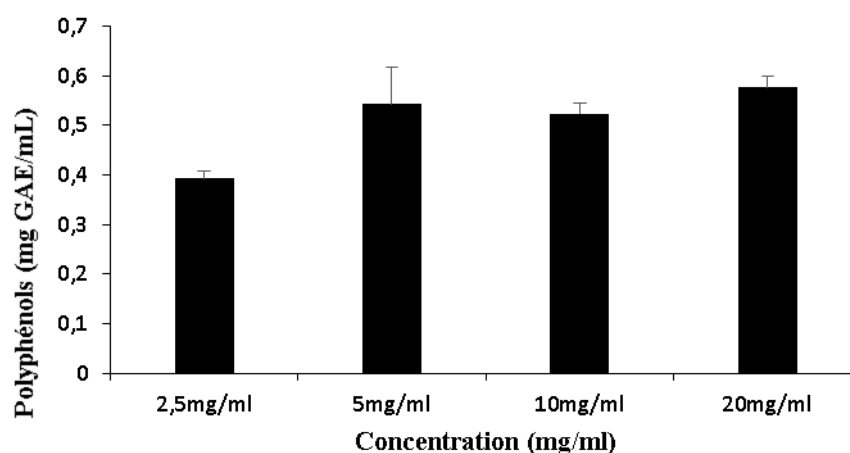


Fig. 19. Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits d'infusion des feuilles de *Punica granatum L.*

L'infusion de feuilles montre une teneur croissante en polyphénols (exprimée en mg GAE/mL) avec l'augmentation de la concentration (2,5 à 20 mg/mL). Les valeurs maximales atteintes suggèrent une bonne extraction des composés phénoliques.

3. 2. 3. Teneur totale en flavonoïdes (les feuilles)

L'analyse des données révèle une différence notable dans la teneur en flavonoïdes entre les extraits aqueux et éthanoliques de la plante. (Fig. 20)

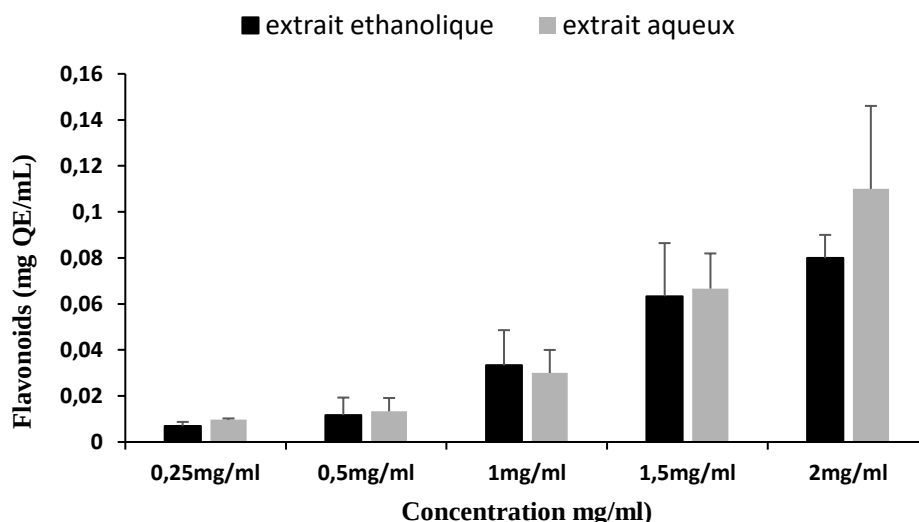


Fig. 20. Variation de la teneur en flavonoïdes dans les extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de *Punica granatum L.*

Les extraits éthanoliques présentent des teneurs en polyphénols systématiquement plus élevées que les aqueux (0,14 vs 0,06 mg GAE/mL à 2 mg/mL). La concentration en polyphénols augmente proportionnellement avec la concentration d'extrait pour les deux solvants.

3. 2. 4. Teneur totale en flavonoïdes (pour l'infusion)

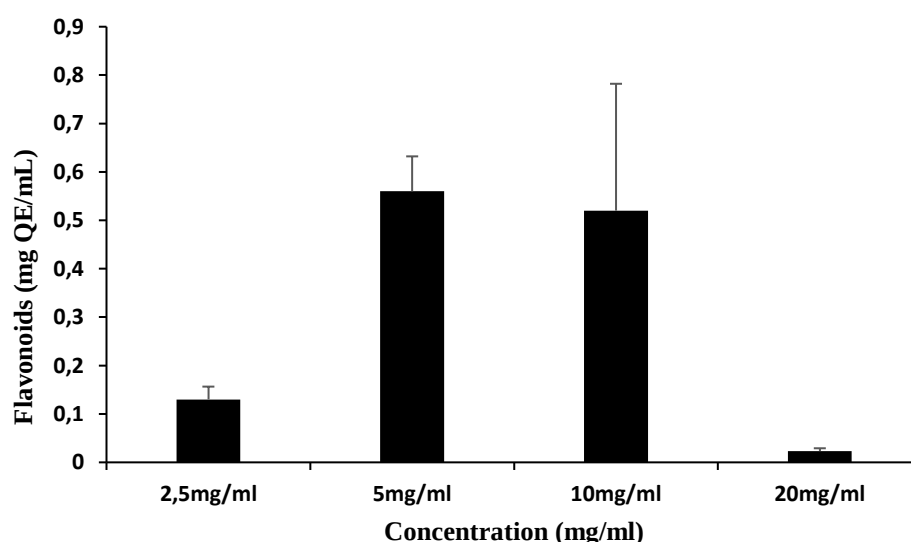


Fig. 21. Variation de la teneur totale en flavonoïdes dans les extraits d'infusion des feuilles de *Punica granatum L.*

La teneur en flavonoïdes augmente significativement entre 2,5 mg/ml et 5 mg/ml. Elle reste stable entre 5 mg/ml et 10 mg/ml. À 20 mg/ml, la concentration chute fortement. Cela suggère une efficacité optimale à des concentrations modérées.

3. 2. 5. Teneur totale en tanins (les feuilles)

L'analyse des données révèle une différence notable dans la teneur en tanins entre les extraits aqueux et éthanoliques de la plante. (Fig. 22)

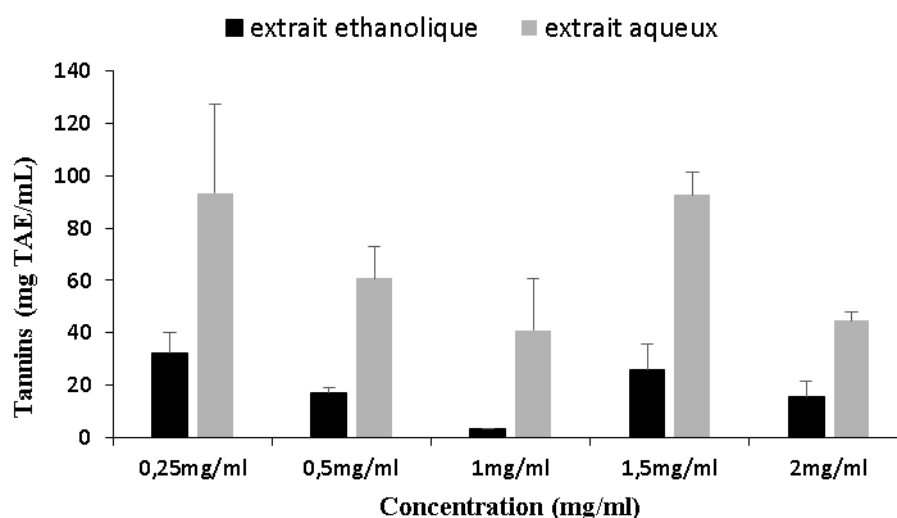


Fig. 22. Variation de la teneur totale en tanins dans les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de *Punica granatum L.*

L'extrait aqueux présente une teneur en tanins significativement plus élevée que l'extrait éthanolique à toutes les concentrations testées. Le pic est observé à 0,25 mg/ml et 1,5 mg/ml pour l'extrait aqueux. L'extrait éthanolique montre une variation modérée sans tendance claire. Ces résultats suggèrent une meilleure extraction des tanins par l'eau.

3. 2. 6. Teneur totale en tanins (pour l'infusion)

L'analyse des données révèle une différence notable dans la teneur en tanins pour l'infusion des écorces de la plante. (Fig. 23)

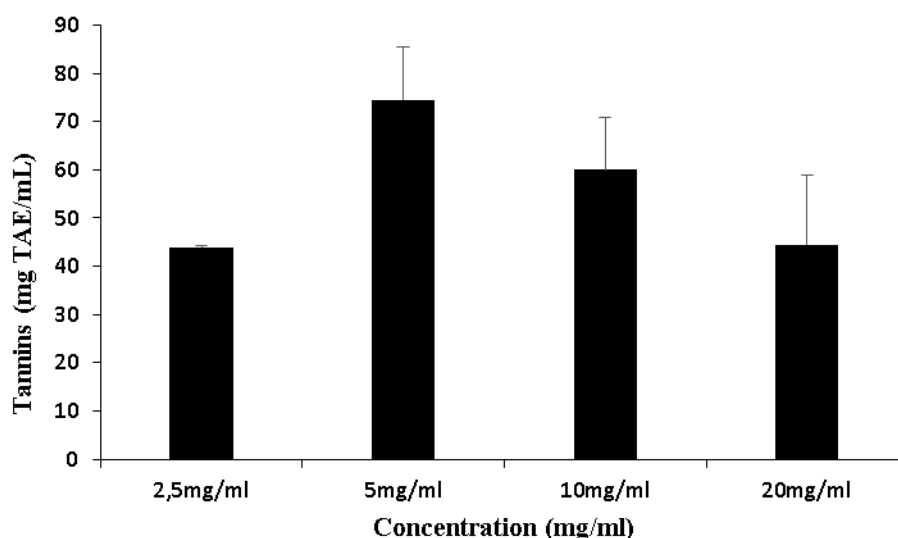


Fig. 23. Variation de la teneur totale en tanins dans les extraits d'infusion des feuilles de *Punica granatum L.*

La teneur en tanins augmente jusqu'à 5 mg/ml, où elle atteint un maximum. Au-delà de cette concentration, une diminution progressive est observée. La variation est modérée entre 10 mg/ml et 20 mg/ml. Ces données suggèrent une solubilité optimale des tanins à concentration moyenne.

4. Évaluation de la cytotoxicité (les écorces)

4.1.1. Morphométrie racinaire pour les écorces

- Nombre des racines

Le nombre de racines d'*Allium cepa* a été mesuré pour chaque traitement, avant et après l'ajout des extraits végétaux au milieu de culture.(Fig. 24)

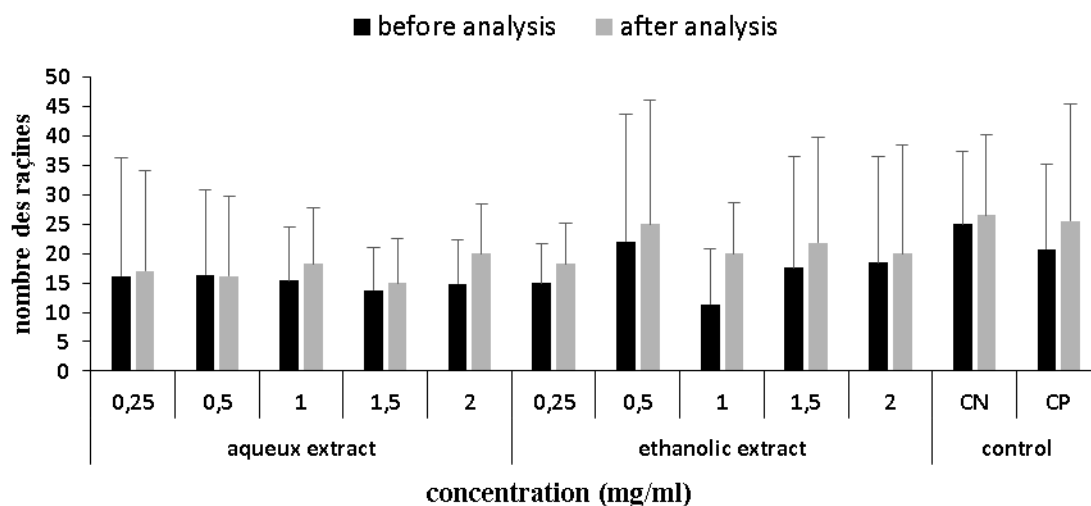


Fig. 24. Nombre de racines avant et après traitement avec des extraits végétaux

Le nombre de racines augmente légèrement après traitement dans la plupart des concentrations, que ce soit pour les extraits aqueux ou éthanoliqes des écorces. Les extraits éthanoliqes semblent induire une élévation plus marquée du nombre de racines à partir de 0,5 mg/mL. Les extraits aqueux montrent un effet plus modéré et constant. Les témoins positif (CP) et négatif (CN) conservent un développement racinaire supérieur.

- Nombre des racines pour l'infusion

Le nombre de racines d'*Allium cepa* a été mesuré pour chaque traitement, avant et après l'ajout de l'infusion des extraits végétaux au milieu de culture.(Fig. 25).

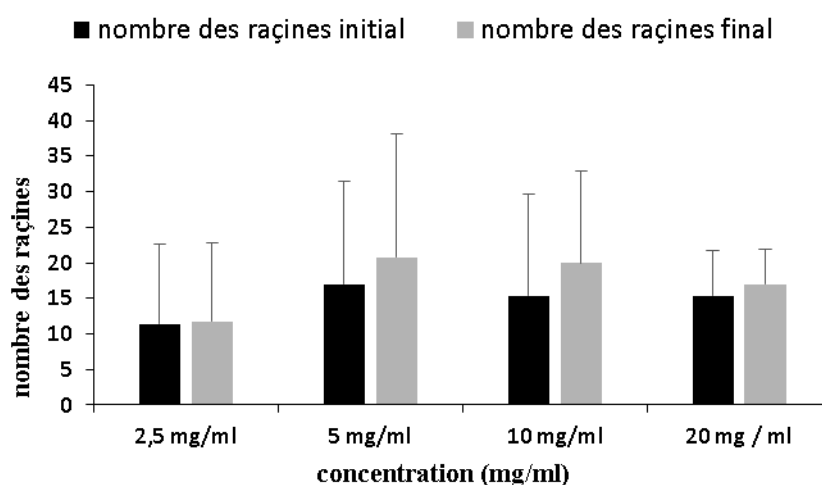


Fig. 25. Nombre de racines avant et après traitement avec des extraits d'écorce de l'infusion

L'infusion des écorces de *Punica granatum L.* induit une légère augmentation du nombre de racines après traitement, comparée aux valeurs initiales. À 2,5 mg/mL, le nombre de racines passe d'environ 11 à 13, tandis qu'à 5 mg/mL, il augmente de 15 à 18, indiquant une meilleure stimulation à cette dose. À 10 mg/mL, le nombre de racines évolue de 13 à 17, tandis qu'à 20 mg/mL, la croissance reste plus faible (de 14 à 15). Ces résultats suggèrent une activité de stimulation racinaire modérée, avec un effet optimal entre 5 et 10 mg/mL.

- Longueur des racines

De même, la longueur des racines a été mesurée avant et après l'ajout des extraits végétaux (les écorces), (Fig. 26).

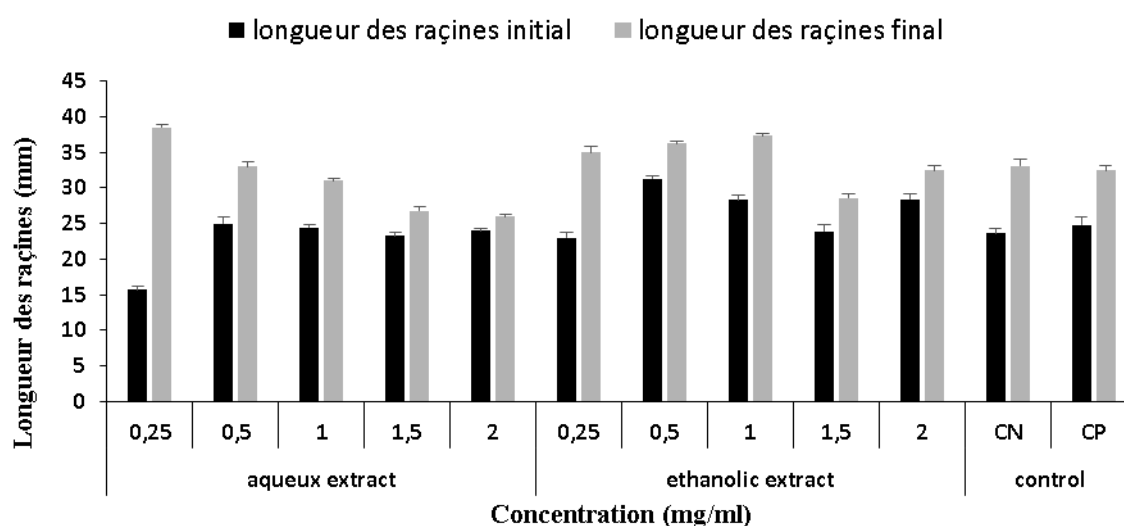


Fig. 26. Longueur des racines avant et après traitement avec des extraits d'écorces.

Ce graphique compare l'effet des extraits aqueux et éthanolique d'écorces sur la longueur initiale et finale des racines. Les deux extraits augmentent la longueur des racines. L'extrait aqueux à 0,25 mg/ml et l'extrait éthanolique à 1 mg/ml montrent les plus grandes augmentations. Les contrôles (CN et CP) présentent également une augmentation de la longueur des racines.

- Longueur des racines pour l'infusion

De même, la longueur des racines a été mesurée avant et après l'ajout des extraits végétaux de l'infusion. (Fig. 27)

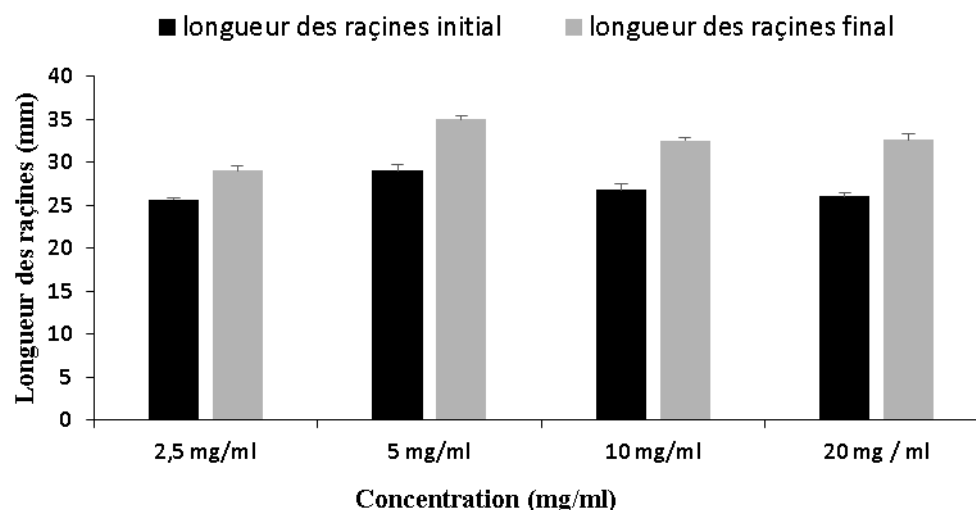


Fig. 27. Longueur des racines avant et après traitement par l'infusion des extraits d'écorces.

Ce graphique montre que la longueur finale des racines est toujours supérieure à la longueur initiale pour toutes les concentrations d'infusion d'écorces. L'infusion à 5 mg/ml semble induire la plus grande augmentation de longueur.

4.2.1. Morphométrie racinaire pour les feuilles

- Nombre des racines

Le nombre de racines d'*Allium cepa* a été mesuré pour chaque traitement, avant et après l'ajout des extraits des feuilles de *Punica granatum L* au milieu de culture.(Fig. 28)

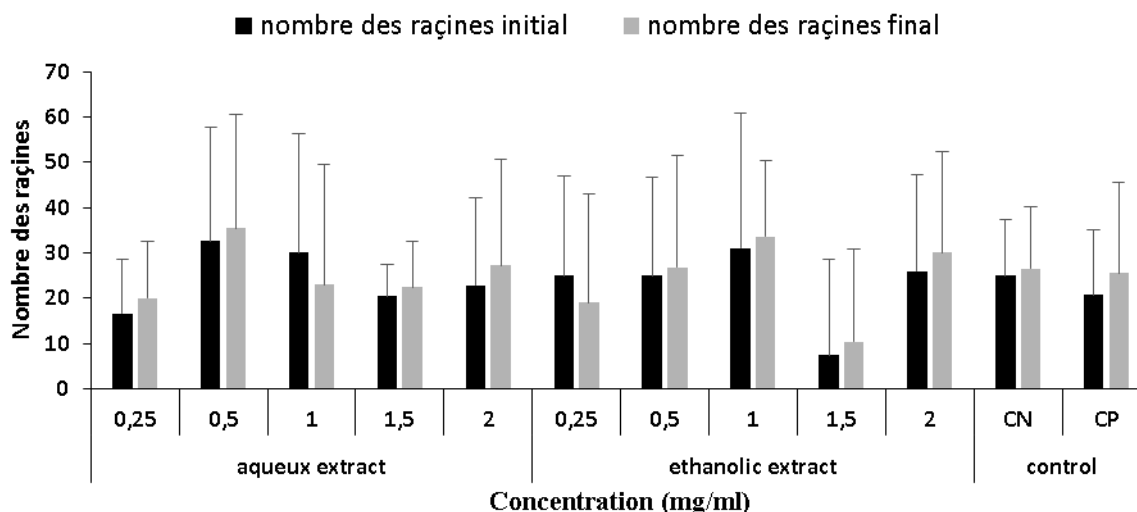


Fig. 28. Nombre de racines avant et après traitement avec des extraits des feuilles.

Le nombre de racines finales augmente avec certaines concentrations des extraits. Pour l'extrait aqueux, la concentration de 0,5 % montre la plus forte augmentation du nombre de racines. À partir de 1 %, une légère diminution est observée. Pour l'extrait éthanolique, la concentration de 1 % stimule fortement l'enracinement, À la concentration de 1,5 mg/ml, l'extrait éthanolique montre une stimulation marquée du nombre de racines finales, légèrement inférieure à celle observée à 1 mg/ml. Les concentrations 0,25 % et 2 % donnent des résultats plus modérés. Les témoins montrent une croissance plus faible comparée aux extraits.

- Nombre des racines pour l'infusion

Le nombre de racines d'*Allium cepa* a été mesuré pour chaque traitement, avant et après l'ajout de l'infusion des extraits végétaux (les feuilles) au milieu de culture.(Fig. 29)

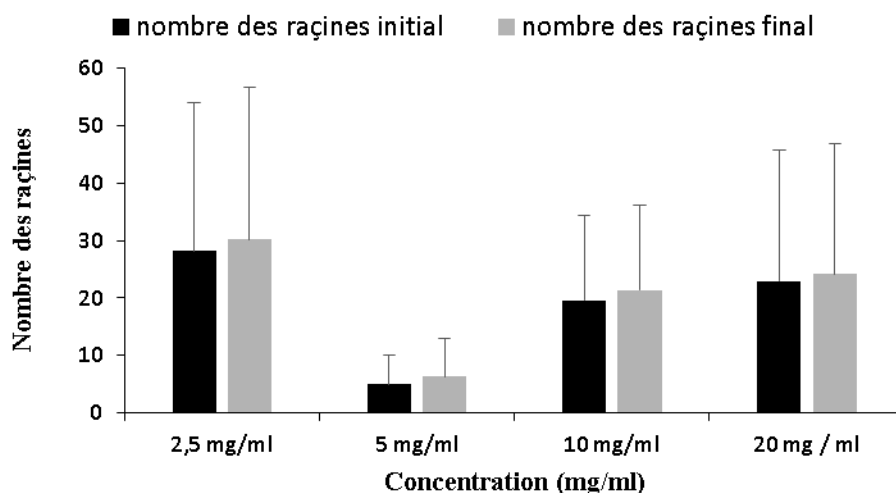


Fig. 29. Nombre de racines avant et après traitement par l'infusion des extraits des feuilles.

Ce graphique compare le nombre initial et final de racines après traitement avec différentes concentrations d'infusion. À 2,5 mg/ml, le nombre de racines reste relativement stable. À 5 mg/ml, le nombre de racines diminue significativement. Aux concentrations de 10 mg/ml et 20 mg/ml, le nombre de racines initial et final est similaire et plus élevé qu'à 5 mg/ml.

- Longueur des racines

La longueur des racines a été mesurée avant et après l'ajout des extraits végétaux (les feuilles), (Fig. 30).

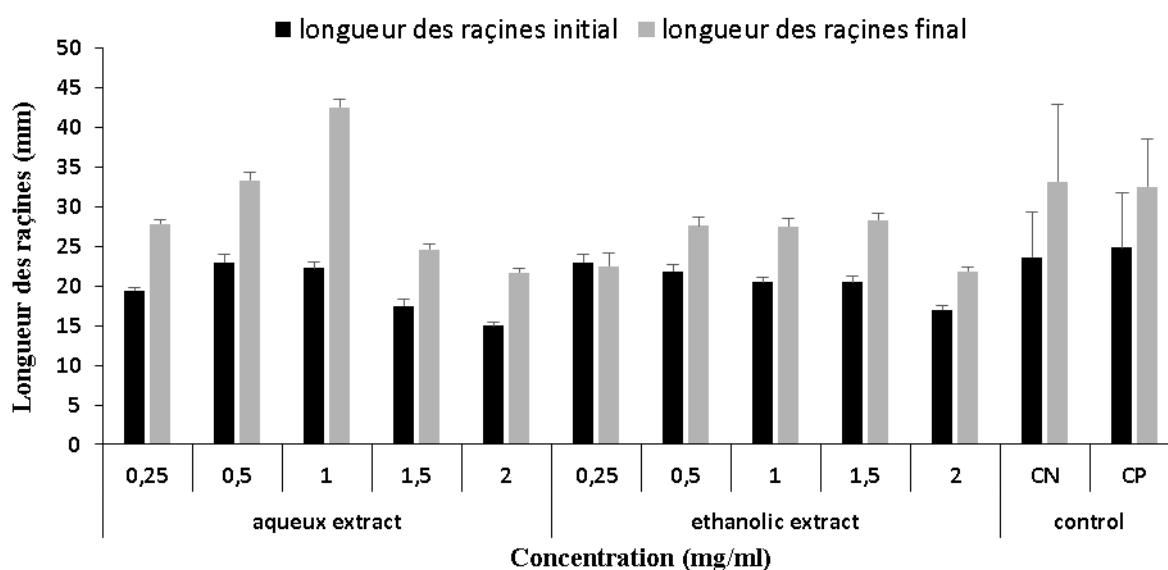


Fig. 30. Longueur des racines avant et après traitement avec des extraits des feuilles.

Ce graphique compare l'effet des extraits aqueux et éthanolique sur la longueur initiale et finale des racines. Pour l'extrait aqueux, la longueur finale des racines est généralement supérieure à la longueur initiale. Pour l'extrait éthanolique, la longueur finale est également supérieure à l'initiale, avec une variabilité similaire. Les contrôles (CN et CP) montrent des longueurs finales supérieures aux initiales.

- Longueur des racines pour l'infusion

De même, la longueur des racines a été mesurée avant et après l'ajout des extraits végétaux (les feuilles) de l'infusion. (Fig. 31)

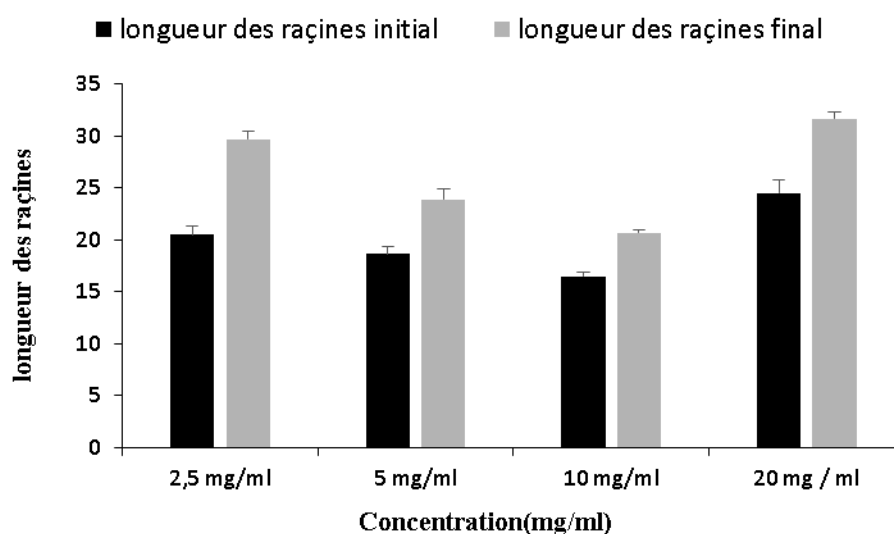


Fig. 31. Longueur des racines avant et après traitement par l'infusion des extraits des feuilles

On observe que l'augmentation de la longueur des racines s'est déroulée de manière normale (ou saine) à toutes les concentrations de l'infusion.

4.3.1. Phases cellulaires (les écorces)

- Indice mitotique

L'analyse des données a démontré que les extraits de *Punica granatum* L ont exercé un effet significatif sur l'indice mitotique des cellules meristimatique d'*Allium cepa*. le taux de l'indice mitotique a fluctué en fonction des concentration et du type d'extrait utilisé (Fig. 32).

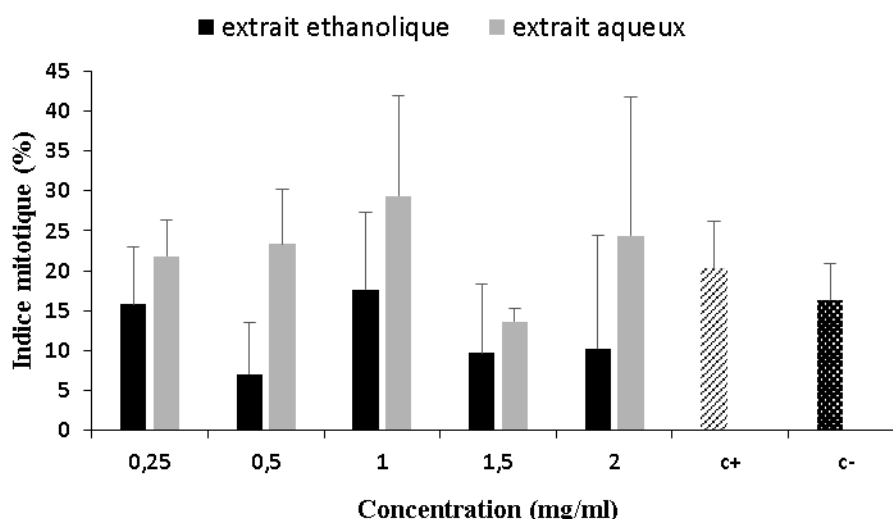


Fig. 32. Effet des extraits de *Punica granatum* L (les écorces) sur l'IM et les phases mitotiques dans les cellules racinaires d'*Allium cepa*.

L'indice mitotique varie significativement selon la concentration et le type d'extrait. L'extrait aqueux présente une activité mitotique plus marquée, atteignant un maximum de près de 30 % à 1 mg/mL, alors que l'extrait éthanolique reste globalement plus modéré, avec un pic autour de 20 % à 1 mg/mL. Aux concentrations élevées (1,5 et 2 mg/mL), une baisse nette est observée.

- Prophase

L'analyse des données a montré que le nombre de cellules en prophase était significativement plus élevé dans tous les traitements. Il apparaît que les extraits de *P. granatum* / n'ont pas affecté le nombre de cellules en prophase (Fig.33).

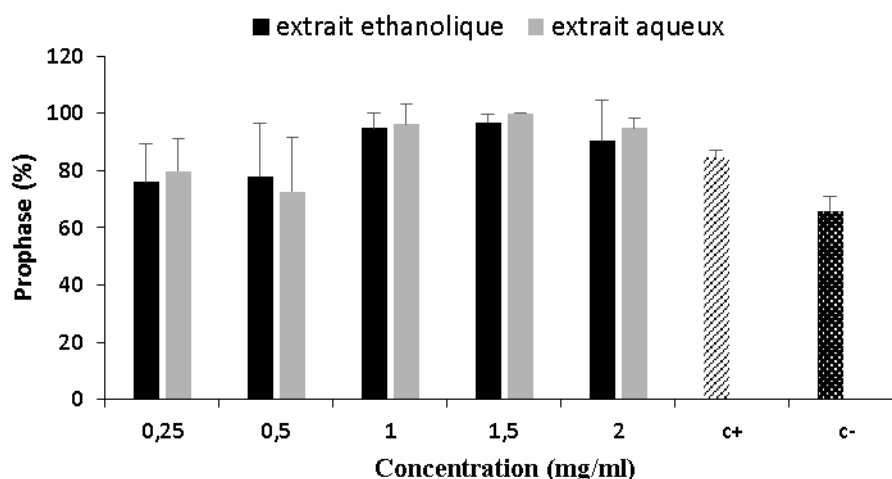


Fig. 33. Effet des extraits de *Punica granatum* L sur la prophase dans les cellules racinaires d'*Allium cepa*.

Le pourcentage de cellules en prophase augmente progressivement avec la concentration des extraits. L'extrait aqueux atteint un maximum d'environ 100 % à 1,5 et 2 mg/mL. L'extrait éthanolique présente une tendance similaire avec des valeurs proches. Les témoins affichent des pourcentages inférieurs, notamment le témoin négatif autour de 65 %.

- Métaphase

Les extraits de *Punica granatum* L altèrent la progression mitotique, avec un effet lié à la concentration et au type d'extraction. (Fig. 34).

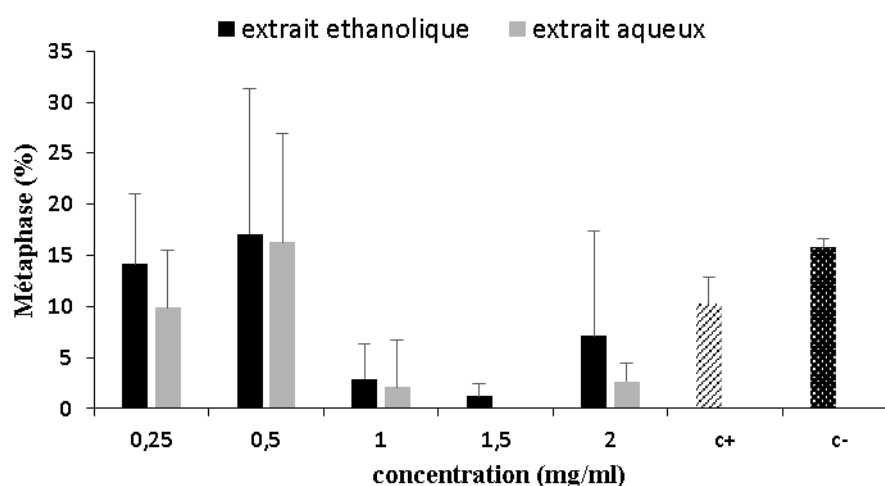


Fig. 34. Effet des extraits de *Punica granatum L* sur la métaphase dans les cellules racinaires d'*Allium cepa*.

Le pourcentage de cellules en métaphase diminue avec l'augmentation des concentrations des extraits. Les valeurs maximales sont observées à 0,5 mg/mL pour les deux extraits (~17 %). À partir de 1 mg/mL, les pourcentages chutent nettement. Le témoin négatif présente la valeur la plus élevée (~16 %), tandis que le témoin positif affiche une valeur intermédiaire (~10 %).

- Anaphase

L'extrait de *Punica granatum L* a affecté de manière significative la phase anaphasique des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa*. À mesure que la concentration de l'extrait augmente, le nombre de cellules en anaphase diminue (Fig. 35).

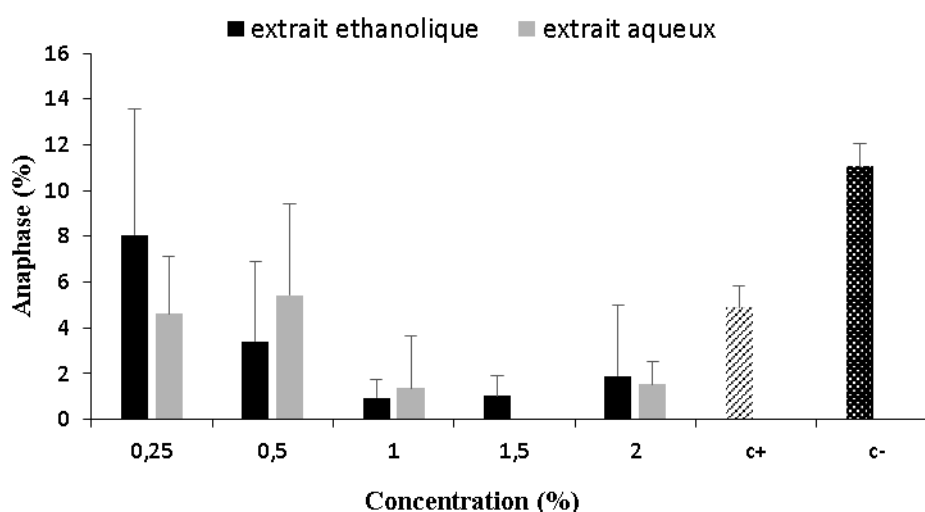


Fig. 35. Effet des extraits de *Punica granatum L* sur l'anaphase dans les cellules racinaires d'*Allium cepa*.

Le graphique illustre l'effet des extraits éthanolique et aqueux de *Punica granatum* sur la fréquence des cellules en phase anaphasique selon différentes concentrations. On observe une diminution progressive du pourcentage de cellules en anaphase avec l'augmentation des doses, notamment pour l'extrait éthanolique. À la concentration de 0,25 %, ce dernier présente la fréquence anaphasique la plus élevée, tandis qu'à partir de 1 %, cette fréquence devient faible pour les deux extraits. Il convient également de noter l'absence de résultats pour l'extrait aqueux à la concentration de 1,5 %.

- Télophase

L'extrait de *Punica granatum L.* a significativement perturbé la phase télophasique des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa*, avec une diminution marquée du nombre de cellules en télophase à des concentrations croissantes (Fig. 36).

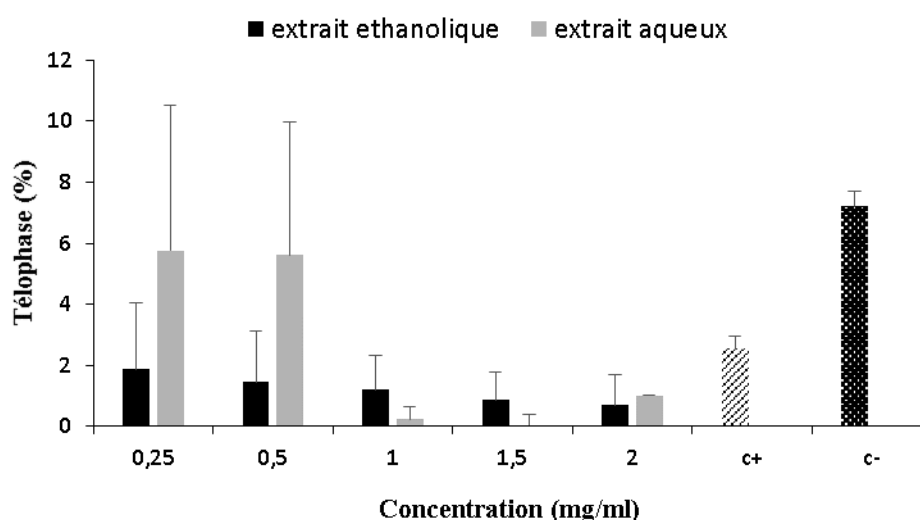


Fig. 36. Effet des extraits de *Punica granatum L* sur la télophase dans les cellules racinaires d'*Allium cepa*.

Le pourcentage de télophase diminue progressivement avec l'augmentation des concentrations pour les deux extraits. L'extrait aqueux présente les pourcentages les plus élevés à faibles doses (0,25–0,5 mg/mL), chutant ensuite à zéro. L'extrait éthanolique affiche une diminution plus régulière, sans suppression complète. Les témoins montrent des valeurs nettement supérieures, notamment pour le contrôle négatif.

- Prophase

Le graphique montre une variation du pourcentage de cellules en prophase en fonction de la concentration d'infusion, avec des différences notables entre les groupes c+ et c-, (Fig. 38).

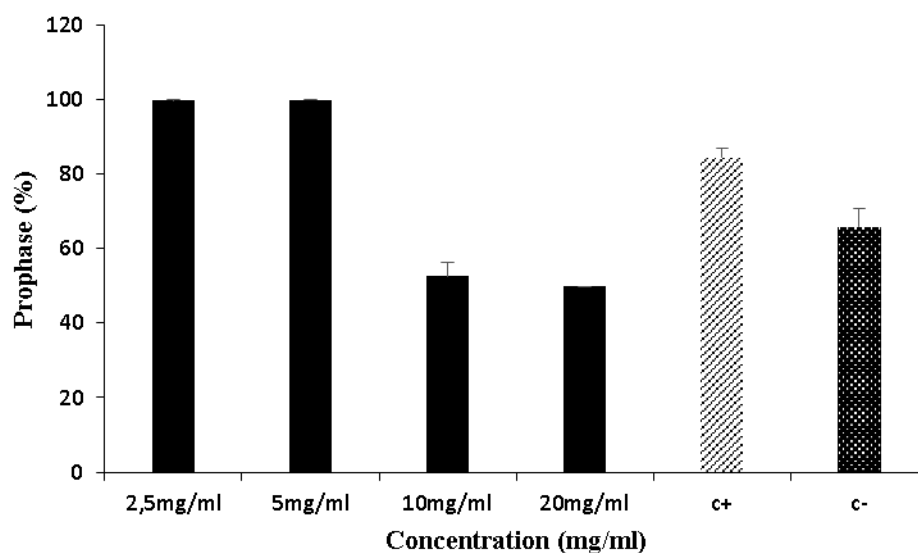


Fig. 38. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en prophase dans les méristèmes racinaires d'*Allium cepa*.

Le pourcentage de cellules en prophase atteint 100 % aux concentrations de 2,5 et 5 mg/mL, Une diminution notable est observée à 10 et 20 mg/mL, avec des valeurs proches de celles des témoins.

- Télophase

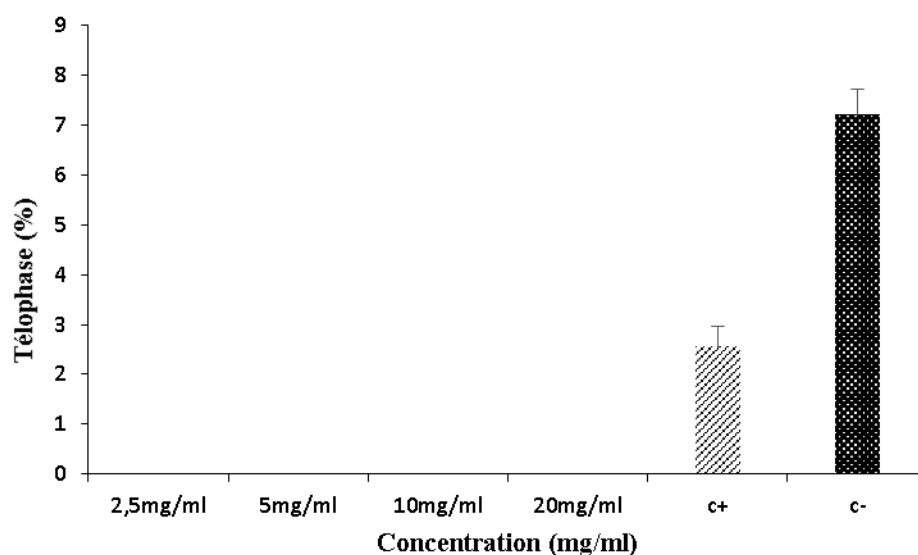


Fig. 41. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en télophase dans les méristèmes racinaires d'*Allium cepa*.

Les pourcentages de télophase sont nuls pour toutes les concentrations de l'infusion testée, tandis qu'ils atteignent environ 3 % pour le témoin positif et 7 % pour le témoin négatif, indiquant une réduction marquée des cellules en télophase dans les échantillons traités.

4.4.1. Phases cellulaires (les feuilles)

- Prophase

L'analyse des données a révélé que le nombre de cellules en prophase était significativement plus élevé dans tous les traitements. Il semble que les extraits de *Punica granatum L* n'aient pas affecté le nombre de cellules en prophase (Fig. 43).

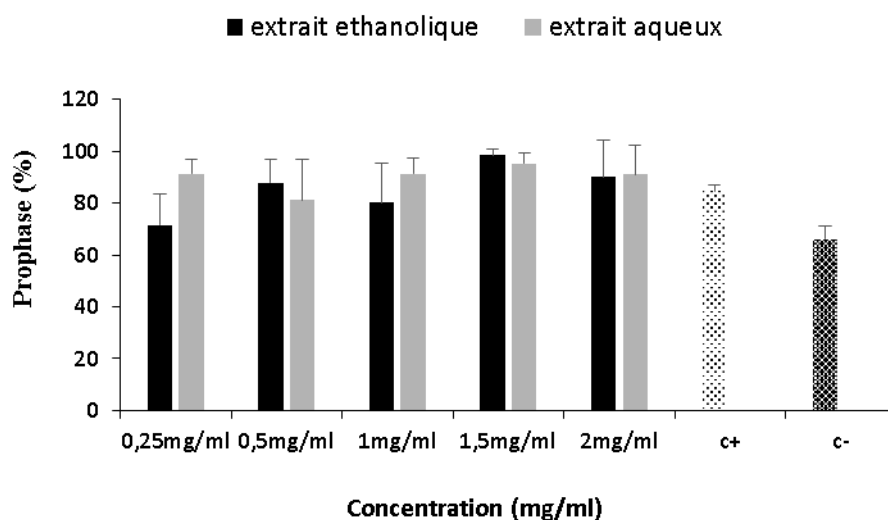


Fig. 43. Effet des extraits de *Punica granatum L* sur la prophase dans les cellules racinaires d'*Allium cepa*.

Le pourcentage de cellules en prophase est élevé pour les deux extraits, en particulier entre 1 et 2 mg/ml. L'extrait éthanolique atteint un maximum à 1,5 mg/ml (~98 %), dépassant nettement les témoins. L'extrait aqueux reste également élevé, avoisinant les 90 %.

- Télophase

L'extrait de *p. granatum l* réduit le nombre de cellules en télophase d'*A. cepa* de manière dose-dépendante, (Fig. 46).

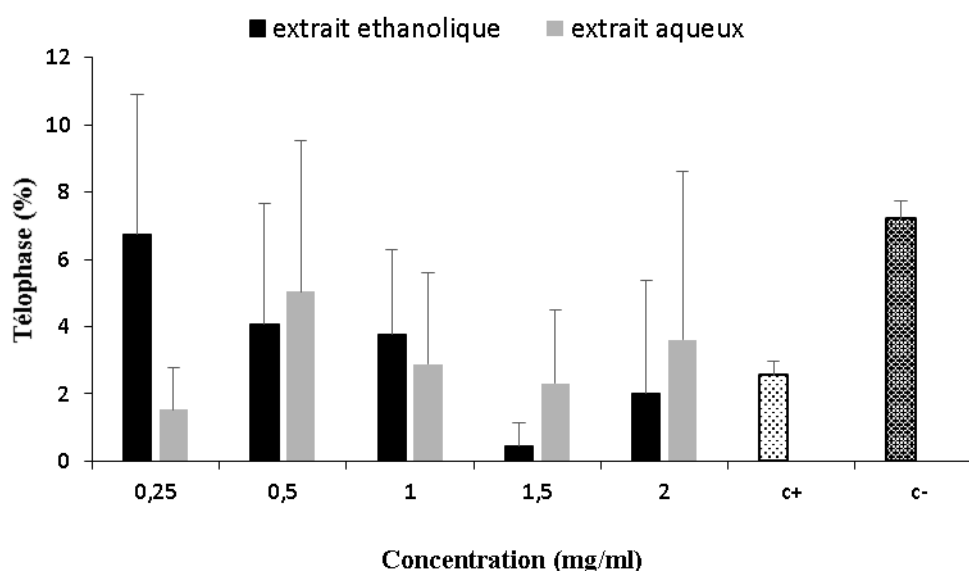


Fig. 46. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en télophase dans les méristèmes racinaires d'*Allium cepa*.

Le pourcentage de télophase diminue avec l'augmentation des concentrations pour les deux extraits. À 0,25 mg/ml, les extraits éthanolique et aqueux affichent respectivement environ 6,8 % et 1,5 %, puis chutent à moins de 2 % à 1,5 mg/ml. À 2 mg/ml, les valeurs restent faibles. Les témoins montrent des taux plus élevés, en particulier le témoin négatif (C-) avec plus de 7 %, indiquant une altération du déroulement mitotique sous l'effet des extraits.

- Prophase

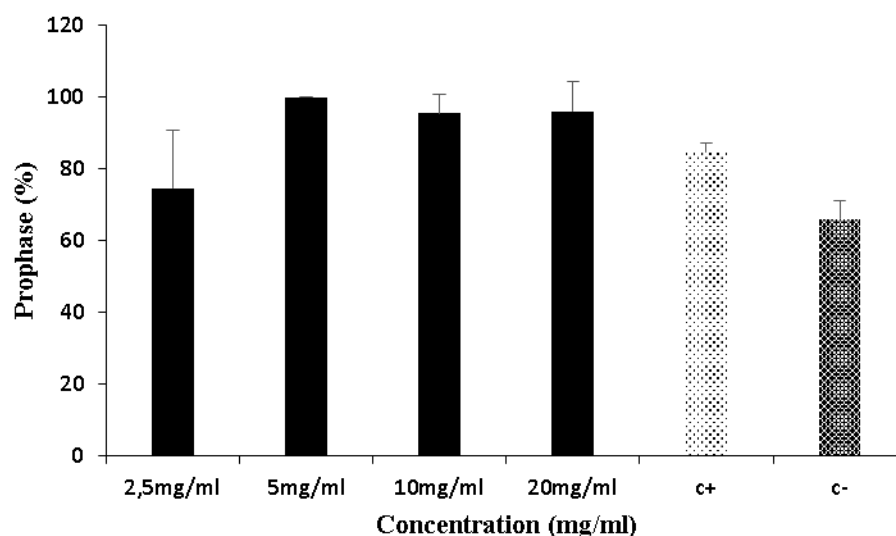


Fig. 48. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en prophase dans les méristèmes racinaires d'*Allium cepa*.

Le pourcentage de cellules en prophase augmente avec la concentration, atteignant un pic à 5 mg/ml. Les valeurs restent élevées aux concentrations supérieures. Le témoin positif (c+) montre une valeur intermédiaire. Le témoin négatif (c-) présente le pourcentage le plus bas. L'infusion influence nettement la répartition des phases mitotiques.

- Télophase

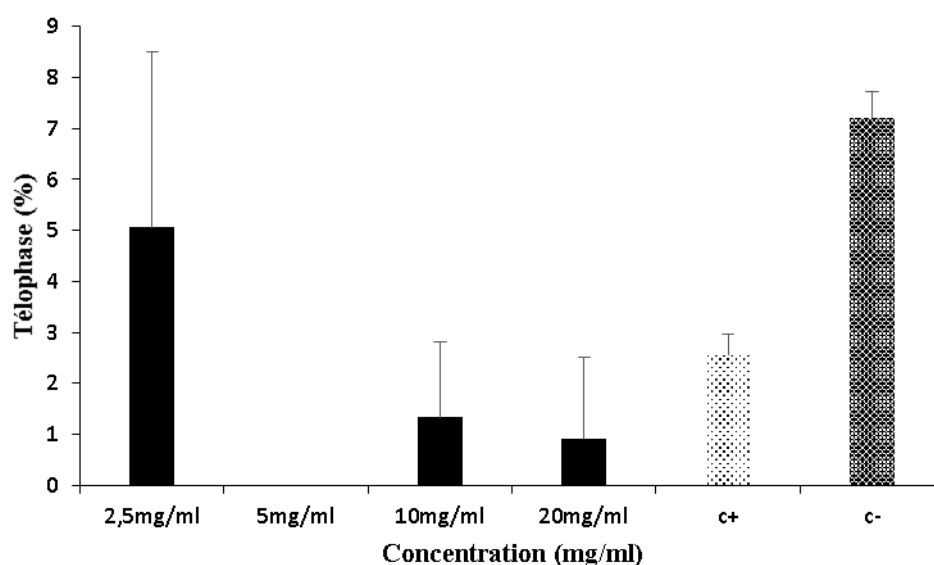


Fig. 51. Effet de différentes concentrations d'extrait sur la fréquence des cellules en télophase dans les méristèmes racinaires d'*Allium cepa*.

Ce graphique illustre que l'infusion à 2,5 mg/ml induit le pourcentage de télophase le plus élevé parmi les concentrations testées. La concentration de 5 mg/ml n'a pas de données représentées. Les concentrations de 10 mg/ml et 20 mg/ml montrent une diminution significative de la télophase. Le contrôle négatif (c-) présente le pourcentage de télophase le plus élevé globalement, tandis que le contrôle positif (c+) affiche un pourcentage intermédiaire.

5. Évaluation de la génotoxicité

- les feuilles

Les anomalies chromosomiques globales dans les pointes racinaires d'*A. cepa* ont été observées au microscope après traitement avec les extraits de *P. granatum l.* L'analyse des données a révélé que les extraits aqueux, éthanolique et l'infusion avaient des effets significatifs sur les chromosomes des pointes racinaires d'*A. cepa*. L'extrait éthanolique a induit plus d'aberrations que l'extrait aqueux.

L'étude met en évidence des signatures d'aberrations chromosomiques spécifiques à chaque condition expérimentale. En conditions témoins, Le contrôle négatif présente 48 aberrations, principalement des polyploïdies (27,1%, 13 cas) et des adhérences métaphasiques (25%, 12 cas).

Le contrôle positif montre 43 aberrations dominées par les perturbations d'anaphase (30,2%, 13 cas). L'extrait aqueux à 0,25 mg/ml induit 112 aberrations, avec une forte proportion de polyploïdies (38,4%, 43 cas) et de C-métaphases (25,9%, 29 cas).

L'extrait éthanolique à 2 mg/ml génère 121 aberrations, marquées par des C-métaphases (47,9%, 58 cas) et des polyploïdies (45,5%, 55 cas). Les infusions présentent des profils variables, avec par exemple à 2,5 mg/ml 61 aberrations comprenant 21,3% de stickiness (13 cas) et 18% de micronoyaux (11 cas).

Ces résultats mettent en évidence que les extraits aqueux et éthanoliques affectent principalement la ségrégation chromosomique, tandis que les infusions perturbent davantage la cohésion chromatidienne.

5. Évaluation de la génotoxicité

- les écorces

Aussi pour les écorces on a des signatures d'aberrations chromosomiques spécifiques à chaque condition expérimentale. En conditions témoins . Le contrôle négatif présente 48 aberrations, principalement des polyploïdies (27,1%) et des adhérences métaphasiques (25%), tandis que le contrôle positif montre 43 aberrations dominées par les perturbations d'anaphase (30,2%).

L'extrait aqueux induit le maximum d'aberrations à 1,5 mg/ml (70 cas) avec une prédominance de micronoyaux (67,1%), alors qu'à 0,25 mg/ml on observe principalement des polyploïdies (41%).

L'extrait éthanolique présente une augmentation dose-dépendante des aberrations, culminant à 2 mg/ml (110 cas) avec une forte incidence de stickiness (80,9%) et de micronoyaux (49,1%).

Les infusions montrent une génotoxicité plus modérée, avec un maximum de 41 aberrations à 10 mg/ml, caractérisées par des polyploïdies (43,9%) et des micronoyaux (41,5%). La comparaison des extraits révèle que l'extrait éthanolique à haute concentration est le plus génotoxique, induisant principalement des anomalies de cohésion chromatidienne (stickiness), tandis que l'extrait aqueux affecte davantage la ségrégation chromosomique (polyploïdies, micronoyaux). Les infusions présentent une génotoxicité intermédiaire avec un profil mixte d'aberrations

Discussion

Discussion

L'usage des plantes médicinales pour la prévention et le traitement des maladies humaines connaît un regain d'intérêt à l'échelle mondiale, tant dans les pays en développement, où elles constituent souvent le principal recours thérapeutique, que dans les pays industrialisés, où elles sont perçues comme des alternatives naturelles aux médicaments de synthèse. (Launay, 2017) Cette popularité est favorisée par la diversité des métabolites secondaires bioactifs qu'elles contiennent, notamment les polyphénols, flavonoïdes et tanins, reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Cependant, en raison de leur usage souvent empirique et non réglementé, il est crucial d'évaluer rigoureusement leur innocuité. (Derbel & Ghedira, 2005)

Le grenadier, *Punica granatum L.*, est particulièrement valorisé pour ses propriétés pharmacologiques multiples : antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes ou anticancéreuses, (Ismail et al., 2012), liés à sa concentration en tanins hydrolysables (notamment punicalagine et acide ellagique), flavonoïdes et autres polyphénols. (Valero-Mendoza et al., 2022), Cependant, certains de ces composés, à hautes concentrations ou extraits via des solvants spécifiques, peuvent interagir avec le matériel génétique ou perturber les processus cellulaires, révélant un potentiel cytogénotoxique insuffisamment documenté (Akinboro & Bakare, 2007).

Dans un premier temps, une enquête ethnopharmacologique menée auprès de vendeurs et de praticiens traditionnels a permis de recenser les usages populaires du grenadier (*Punica granatum*), notamment pour le traitement des troubles digestifs, des inflammations et des infections. Ces données ont mis en évidence une valorisation fréquente des écorces et des feuilles dans les préparations médicinales locales. Ainsi, notre étude vise à évaluer la sécurité cytogénotoxique des extraits aqueux et éthanoliques d'écorces et de feuilles de grenadier. À travers le test *Allium cepa*, modèle éprouvé pour détecter des effets mutagènes, nous avons cherché à observer des perturbations mitotiques, des aberrations chromosomiques et des modifications de l'indice mitotique. Ces résultats ont ensuite été mis en relation avec des données phytochimiques afin de proposer une interprétation mécanistique selon la nature d'extraction, la partie de la plante utilisée et la concentration testée.

Les résultats ethnopharmacologiques obtenus dans cette étude, mettant en avant l'usage du grenadier (*Punica granatum*) pour les troubles digestifs, les inflammations et les infections, sont confirmés par des recherches *in vitro* et *in vivo*. BenSaad et al. (2017), montrent clairement que l'ellagic acid, l'acide gallique et la punicalagine A&B réduisent significativement la production de NO, PGE-2 et IL-6 dans les macrophages RAW 264.7 stimulés par LPS. Une autre étude menée par Mastrogiovanni et al. (2019) a confirmé les effets anti-inflammatoires des extraits de pelure de grenade (PPE) à une concentration de 5 µg/mL, en montrant une réduction significative de la sécrétion de CXCL8/IL-8 dans des cellules Caco-2 stimulées par le TNF, ainsi que dans des explants coliques porcins exposés au LPS. L'étude a également mis en évidence une suppression de l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires IL1A ($p < 0,05$) et IL6 ($p < 0,01$) dans les tissus *ex vivo*, suggérant un potentiel effet anti-inflammatoire intestinal des extraits de grenade dans des modèles humains et animaux. Sur le plan digestif, Zhao et al. (2018) ont confirmé ces propriétés antidiarrhéiques en utilisant une fraction éthanoïque enrichie en punicalagine, corilagine et acide ellagique à des doses de 100 à 400 mg/kg, réduisant notablement le transit intestinal et l'entéropooling. Enfin, l'activité gastroprotectrice a été confirmée *in vivo* : Yaseen et al. (2023) ont montré que le jus de pelure de grenade réduit significativement les ulcères gastriques induits par l'indométhacine chez le rat, en diminuant l'acidité et le volume de suc gastrique, tout en augmentant la production de mucus et en préservant l'intégrité de la muqueuse. Ainsi, ces études expérimentales récentes et validées renforcent les propriétés digestives, anti-inflammatoires et antimicrobiennes du grenadier, confirmant son utilisation traditionnelle dans le traitement des affections digestives et inflammatoires.

L'extraction phytothérapeutique repose essentiellement sur le choix du solvant, qui conditionne la nature et la quantité des métabolites secondaires extraits. (Jones & Kinghorn, 2012), Dans notre étude, deux types d'extraits ont été préparés à partir des feuilles et des écorces de *Punica granatum L.* : un extrait aqueux et un extrait éthanolique à 70 %, chacun ayant des caractéristiques chimiques distinctes et, par conséquent, des effets biologiques potentiellement différents. (Yi et al., 2012)

L'extrait aqueux, obtenu par macération de la poudre végétale dans de l'eau distillée, permet l'extraction préférentielle des composés hydrosolubles et hautement polaires tels que les tanins hydrolysables, flavonoïdes glycosylés, et certains acides phénoliques. (Ng et al.,

2020) Ces composés sont traditionnellement associés à des effets antioxydants, astringents et anti-inflammatoires. (Bekara et al., 2016), Toutefois, en raison de sa forte polarité, l'eau n'est pas un solvant efficace pour extraire les composés lipophiles, ce qui peut limiter la diversité chimique de l'extrait et réduire, dans certains cas, sa puissance biologique. (Ochoa & Raul, 2005).

En revanche, l'extrait éthanolique (70 % éthanol) permet d'extraire une gamme beaucoup plus large de métabolites, en particulier les composés à polarité intermédiaire, comme les flavonoïdes aglycones, les acides phénoliques libres, les stérols, alcaloïdes, terpénoïdes. (Abaza et al., 2011), L'éthanol, en tant que solvant organique semi-polaire, favorise l'extraction de ces molécules bioactives, souvent responsables d'une activité antioxydante, antimicrobienne, ou cytotoxique plus marquée. (Krimat et al., 2017) C'est pourquoi l'extrait éthanolique est généralement considéré comme plus concentré en principes actifs, bien que son utilisation nécessite une évaporation soigneuse du solvant pour éviter toute toxicité résiduelle. (Bauer & Burgot, 2001).

Les différences observées entre les deux extraits au niveau de l'activité cytogénotoxique peuvent donc être directement corrélées à leur profil chimique respectif. Tandis que l'extrait aqueux tend à présenter une activité biologique plus modérée, en raison de sa richesse en tanins hydrosolubles et en flavonoïdes simples, il demeure toutefois plus sensible aux contaminations microbiologiques. En effet, l'activité de l'eau (a_w) joue un rôle clé dans la stabilité des extraits végétaux, influençant fortement la croissance microbienne ainsi que la production éventuelle de métabolites secondaires indésirables. (Beuchat, 2017), l'extrait éthanolique, plus riche en polyphénols complexes et en molécules lipophiles, peut exercer une action plus intense sur la division cellulaire, incluant des effets cytotoxiques ou génotoxiques potentiels lorsqu'il est utilisé à forte concentration. (Cruz et al., 2016)

L'extrait éthanolique extrait une quantité plus élevée de polyphénols aux faibles et moyennes concentrations, atteignant un pic à 2 mg/mL, La teneur en composés phénoliques augmente proportionnellement à l'élévation des concentrations de l'extrait. Selon Haimoud et al. (2022), il a été confirmé que les extraits éthanoliques présentent généralement des teneurs plus élevées en polyphénols que les extraits aqueux, notamment à des concentrations élevées. Les études menées par Sreedevi et al. (2017) ainsi que Yu et al. (2021) démontrent que *P. granatum l* (feuilles et écorces) est riche en composés phénoliques. La teneur en polyphénols

totaux mesurée dans notre étude pour l'extrait éthanolique des écorces et feuilles de *Punica granatum* L. est de $0,52 \pm 0,04$ mg EAG/mL pour les écorces, et pour les feuilles aussi $0,52 \pm 0,02$ mg EAG/mL à une concentration d'extrait de 2 mg/mL. En comparaison, Sreedevi et al. (2017) ont rapporté une teneur beaucoup plus élevée, avec $394,16 \pm 0,76$ mg EAG/g d'extrait sec pour des extraits d'écorce de grenade. Ces valeurs pourraient résulter d'une méthode d'extraction plus efficace ou d'une variété de grenadier naturellement plus riche en flavonoïdes.

Pour les infusions, la teneur en polyphénols augmente également avec la concentration, atteignant un maximum d'environ $0,68 \pm 0,02$ mg EAG/mL pour les écorces et $0,57 \pm 0,02$ mg EAG/mL pour les feuilles à 20 mg/mL. Cela montre que même les méthodes d'extraction traditionnelles comme l'infusion permettent une récupération significative des polyphénols, ce qui est important pour la valorisation des extraits dans des applications alimentaires ou médicinales.

Les flavonoïdes, sous-classe importante des polyphénols (Ku et al., 2020), suivent une tendance similaire. Les extraits éthanoliques contiennent plus de flavonoïdes que les extraits aqueux, avec une différence qui s'accroît aux concentrations élevées. Cette observation confirme que l'éthanol est plus adapté pour extraire ces composés, souvent moins hydrosolubles. Pour les infusions, la teneur en flavonoïdes augmente progressivement jusqu'à $1,07 \pm 0,06$ mg QE/mL pour les écorces et $0,56 \pm 0,005$ mg QE/mL pour les feuilles. et de manière dose-dépendante jusqu'à une concentration modérée (5 mg/mL), avant de diminuer à 20 mg/mL dans les feuilles suggérant une possible saturation ou dégradation des flavonoïdes à forte concentration. Dans notre étude, la teneur maximale en flavonoïdes des extraits éthanoliques de *Punica granatum* L des écorces atteint environ $0,2 \pm 0,01$ mg QE/mL à 2 mg/mL. Et pour les feuilles $0,08 \pm 0,01$ mg QE/mL à 2 mg/mL dans l'extrait éthanolique. Ces valeurs sont remarquablement faibles comparées à d'autres études : par exemple, Zhang et al. (2023) ont quantifié les feuilles de grenadier à $84 \pm 0,55$ mg RE/g poids frais. En parallèle, une autre étude de Samira et al. (2019) indique des teneurs en flavonoïdes de 25,9–30,8 mg EC/g dans l'écorce de *Punica granatum*. Les faibles teneurs en flavonoïdes obtenues dans notre étude peuvent s'expliquer par la faible concentration de l'extrait (2 mg/mL) et l'absence de concentration ou de séchage préalable, contrairement aux études de Zhang et al. (2023) et Samira et al. (2019) qui ont travaillé sur des extraits secs ou fortement concentrés.

L'analyse des données met en évidence une différence marquée dans la teneur en tanins entre les extraits aqueux et éthanoliques de *Punica granatum L.*, aussi bien pour les écorces que pour les feuilles. Pour les écorces, l'extrait aqueux présente systématiquement des teneurs en tanins supérieures à celles de l'extrait éthanolique, notamment aux concentrations de 1 mg/mL et 2 mg/mL, où les valeurs atteignent respectivement 31.62 ± 2.74 mg TAE/mL, contre 17.34 ± 1.98 mg TAE/mL pour l'extrait éthanolique. Cette supériorité de l'extraction aqueuse s'explique par la nature hydrophile des tanins, qui favorise leur solubilité dans l'eau. En comparaison, Abid et al. (2017) ont rapporté que l'extrait aqueux de peaux de grenade tunisiennes contenait jusqu'à 236.69 ± 0.12 mg TAE/g d'extrait sec, contre seulement 129.20 ± 0.27 mg TAE/g avec l'éthanol. Ainsi, bien que nos extraits soient dilués (2 mg/mL), leur richesse relative en tanins reste cohérente avec les tendances observées dans la littérature, confirmant la supériorité de l'eau comme solvant d'extraction des tanins.

Pour les feuilles, la tendance reste similaire : l'extrait aqueux affiche des teneurs en tanins nettement supérieures à l'extrait éthanolique à toutes les concentrations testées, avec des pics observés à 0,25 mg/mL et 1,5 mg/mL. Dans le cas des infusions d'écorces et des feuilles, la concentration maximale en tanins atteint jusqu'à 70 mg TAE/mL à une concentration d'extrait de 20 mg/mL pour l'écorces et 5 mg/mL dans les feuilles, démontrant clairement l'efficacité de l'eau chaude pour libérer ces composés. Cette valeur élevée souligne non seulement la richesse en tanins des écorces, mais aussi la capacité de l'infusion à extraire efficacement ces molécules. (De Carvalho Rodrigues et al., 2015)

Les extraits de feuilles et d'écorces de *Punica granatum L.* influencent de manière variable la croissance racinaire d'*Allium cepa*, selon le type d'extrait (aqueux, éthanolique, infusion) et la concentration appliquée. Une augmentation modérée du nombre de racines est observée après traitement, notamment avec les extraits éthanoliques d'écorces (pic à 0,5 mg/mL) et de feuilles (pic à 1 %), traduisant une stimulation de l'initiation racinaire. L'infusion des écorces exerce également un effet favorable, particulièrement entre 5 et 10 mg/mL. Concernant la longueur des racines, les extraits aqueux et éthanoliques de feuilles et d'écorces entraînent une amélioration notable, avec des effets maximaux à faibles concentrations (0,25 à 1 mg/mL). L'infusion accentue aussi cet allongement, avec un effet optimal observé à 5 mg/mL. Ces réponses biologiques suggèrent l'implication de composés bioactifs tels que les polyphénols,

flavonoïdes et tanins, susceptibles d'agir sur la division et l'élongation cellulaires, (Gaspar et al., 2016) via des mécanismes hormonaux (notamment auxines et cytokinines) (W. Khan et al., 2009). À des concentrations plus élevées, une stabilisation ou une légère inhibition de ces paramètres est observée, traduisant un effet dose-dépendant.

Les effets cytotoxiques des extraits aqueux et éthanoliques pour les deux organes, évalués par le test d'*Allium cepa*, révèlent une inhibition de la croissance dans tous les traitements. L'extrait éthanolique présente l'effet cytotoxique le plus marqué comparé à l'extrait aqueux. La concentration qui bloque les phases du cycle cellulaire est la quatrième, soit 1.5 mg/mL. Concernant la génotoxicité, l'extrait éthanolique induit davantage d'aberrations chromosomiques à mesure que la concentration augmente. Ainsi, la concentration de 2 mg/mL est celle qui provoque les dommages chromosomiques les plus importants.

Encore plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont été menées pour évaluer les effets cytotoxiques et génotoxiques des extraits de *P. granatum L.* Selon les travaux rapportés dans l'étude de (Mokgalaboni et al., 2023a), menés sur des modèles animaux de diabète (induits principalement par la streptozotocine ou un régime riche en graisses), l'administration d'extraits de *Punica granatum* (sous forme de jus, poudre, écorce ou feuilles) comme Les extraits de pelures ont été testés à des doses de 250 à 300 mg/kg pendant 4 semaines, entraîné une réduction significative du stress oxydatif. Cette action s'est traduite par une diminution des niveaux de ROS, MDA et TBARS, ainsi qu'une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes telles que la SOD, la CAT, le GSH et la GPx. Parallèlement, les marqueurs inflammatoires tels que TNF- α , IL-6, IL-1 β , CRP et NF- κ B ont également été réduits.

En 2023, Minutolo et al ont réalisé une étude *in vitro* portant sur les effets antioxydants et antiprolifératifs d'un extrait aqueux de *Punica granatum* obtenu par cavitation hydrodynamique. L'extrait fractionné (L-M3), riche en composés phénoliques, a été testé sur la lignée tumorale mammaire humaine AU565-PAR ainsi que sur des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains. Les résultats ont montré que la fraction L-M3 inhibait significativement la prolifération des cellules cancéreuses, réduisait la production intracellulaire de ROS, tout en préservant l'intégrité des cellules normales. Ces observations

soulignent le potentiel sélectif de cet extrait de grenade dans des approches thérapeutiques anticancéreuses, avec un bon profil de tolérance cellulaire (Minutolo et al., 2023).

De récentes recherches confirment que divers phytoconstitués peuvent induire des effets cytogénétiques et cytotoxiques, mettant en évidence la nécessité d'évaluer la sécurité des extraits végétaux. Par exemple, De Freitas et al. (2020) ont démontré que le flavonoïde licochalcone A, isolé de *Glycyrrhiza* spp., provoque une cytotoxicité significative dans les cellules CHO à partir de 147 μ M, et freine la division nucléaire dès 11,8 μ M, tout en présentant une activité génotoxique détectée par le test du comète et la réduction de l'indice de division nucléaire. Des alcaloïdes comme la colchicine, ainsi que des agents apparentés comme l'oryzalin, sont couramment utilisés pour induire la polyploïdie in vitro et ex vitro chez de nombreuses plantes médicinales. Ils bloquent la formation des microtubules, provoquant la duplication du matériel chromosomique chez des espèces telles que *Allium*, *Ajuga*, *Papaver* ou *Stevia* (Dhooghe et al., 2011 ; Tsai et al. (2021). Cette polyploïdie est fréquemment associée à une augmentation de la teneur en phénols, flavonoïdes et terpénoïdes, comme observé chez la camomille, *Plantago* ou *Wedelia chinensis*, ce qui renforce la production de métabolites médicinaux (Madani et al., 2021 ; Manzoor et al., 2019).

Dans notre étude pour les deux organes (les feuilles et l'écorces), les aberrations d'anaphase-télophase (telles que les ponts chromosomiques, chromosomes vagabonds et perturbations de séparation) se sont révélées peu fréquentes dans les cellules traitées par les extraits de feuilles de grenadier, tous solvants confondus. À titre d'exemple, même aux concentrations les plus actives (0,25 mg/ml), ces anomalies ne dépassent pas 5 cas isolés (ex. : 3 chromosomes vagabonds, 2 perturbations), contre 43 cas de polyploïdie et 29 cas d'adhérence chromosomique en métaphase. Cette prédominance des aberrations de type métaphasique ou interphasique (micronoyaux, polyploïdie, stickiness) indique que les extraits n'induisent que faiblement des dommages directs au moment de la séparation des chromatides. Ces résultats suggèrent plutôt une action précoce sur l'organisation du fuseau mitotique ou la condensation chromatiniennne, sans altérer fortement les phases terminales de la mitose. Ce profil d'action est en accord avec l'étude de Rummun et al. (2022), qui ont démontré qu'un extrait de feuilles de *Punica granatum* (PLE) induit une instabilité chromosomique (CIN) dans des cellules

humaines HT1080, marquée par la formation de micronoyaux, ponts nucléoplasmiques, fuseaux multipolaires ainsi qu'une arrestation du cycle cellulaire en phase G2/M.

L'indice mitotique (IM) représente le pourcentage de cellules en division par rapport au nombre total de cellules observées dans un tissu donné. Il constitue un indicateur essentiel de l'activité proliférative cellulaire et permet d'évaluer la toxicité cytogénique de nombreuses substances, notamment les extraits de plantes médicinales (Fenech, 2000). Une diminution significative de l'indice mitotique est généralement interprétée comme une inhibition de la division cellulaire, suggérant un stress génotoxique, un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 ou une perturbation de la synthèse de l'ADN (Leme & Marin-Morales, 2009). À l'inverse, une augmentation de l'IM peut résulter d'une activation compensatoire de la prolifération ou d'un dysfonctionnement des points de contrôle mitotiques, parfois lié à un effet aneugène (Türkoğlu, 2008). L'essai *Allium cepa*, largement utilisé pour mesurer l'IM, constitue un test de référence validé pour la biosurveillance environnementale et l'évaluation des extraits végétaux.

Conclusion

Conclusion

De nombreuses plantes médicinales jouent un rôle crucial dans les thérapies traditionnelles à travers différentes cultures. Parmi celles-ci, *Punica granatum* L. (grenadier), largement cultivé dans toute la région méditerranéenne, y compris en Algérie, est couramment utilisé en médecine traditionnelle pour ses propriétés anti-inflammatoires, digestives et antidiarrhéiques remarquables. Cependant, comme toutes les plantes médicinales, le grenadier peut présenter certains effets indésirables qui nécessitent une attention particulière.

Notre étude approfondie a évalué systématiquement à la fois le potentiel thérapeutique et le profil de sécurité du *P. granatum* à travers des enquêtes ethnopharmacologiques et des analyses en laboratoire. Les résultats révèlent que si les extraits aqueux et éthanoliques d'écorce et de feuilles de grenadier présentent une valeur médicinale significative (avec des concentrations plus élevées en polyphénols dans les extraits éthanoliques, atteignant 0,52 mg GAE/mL), ils démontrent également des effets cytotoxiques et génotoxiques dose-dépendants lors des tests sur *Allium cepa*. Notamment, l'extrait éthanolique a montré une toxicité plus importante que les préparations aqueuses à des concentrations dépassant 1 mg/mL, se manifestant principalement par des phénomènes de stickiness chromosomique et de formation de micronoyaux.

Ces résultats soulignent que malgré les bienfaits thérapeutiques bien documentés du grenadier, des précautions appropriées concernant le dosage et les méthodes de préparation sont essentielles pour atténuer les risques potentiels. Des études plus approfondies sont clairement nécessaires pour élucider complètement le profil toxicologique du *P. granatum* et établir des lignes directrices pour une utilisation sûre, en particulier pour des applications thérapeutiques à long terme. Cette recherche apporte des informations précieuses sur la double nature du grenadier, à la fois comme ressource médicinale et comme source potentielle de toxicité en cas d'utilisation inappropriée.

Les références :

- Launay, A. (2017). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales — cinquième édition J. Bruneton, Éditions Lavoisier Tec & ; Doc, 2016, 1 488 p, 195,00 € . Phytothérapie, 15(5), 316. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1173-5>
- Derbel, S., & Ghedira, K. (2005). Phytonutriments and their impact on health. Phytothérapie, 3(1), 28-34. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0061-6>
- Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts : A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. Journal Of Ethnopharmacology, 143(2), 397-405. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.004>
- Valero-Mendoza, A., Meléndez-Rentería, N., Chávez-González, M., Flores-Gallegos, A., Wong-Paz, J., Govea-Salas, M., Zugasti-Cruz, A., & Ascacio-Valdés, J. (2022). The whole pomegranate (*Punica granatum*. L), biological properties and important findings : A review. Food Chemistry Advances, 2, 100153. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100153>
- Akinboro, A., & Bakare, A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. Journal Of Ethnopharmacology, 112(3), 470-475. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.014>
- Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of Plant Secondary Metabolites. Methods In Molecular Biology, 341-366. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13
- Yi, T., Lo, H., Zhao, Z., Yu, Z., Yang, Z., & Chen, H. (2012). Comparison of the Chemical Composition and Pharmacological Effects of the Aqueous and Ethanolic Extracts from a Tibetan “Snow Lotus” (*Saussurea laniceps*) Herb. Molecules, 17(6), 7183-7194. <https://doi.org/10.3390/molecules17067183>
- Ng, Z. X., Samsuri, S. N., & Yong, P. H. (2020). The antioxidant index and chemometric analysis of tannin, flavonoid, and total phenolic extracted from medicinal plant foods with the solvents of different polarities. Journal Of Food Processing And Preservation, 44(9). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14680>
- Bekara, A., Hamadouche, N. A., Kahloula, K., Sadi, N., & Aoues, A. (2016). Etude phytochimique et activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L. DOAJ (DOAJ : Directory Of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/9ae2d33d86b64d9e8c1d86155c2ff8b4>
- Ochoa, H., & Raul, L. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné « solvant/actif » d'origine végétale. <https://oatao.univ-toulouse.fr/7399/>
- Abaza, L., Youssef, N. B., Manai, H., Haddada, F. M., Methenni, K., & Zarrouk, M. (2011). Chétoui olive leaf extracts : influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. Grasas Y Aceites, 62(1), 96-104. <https://doi.org/10.3989/gya.044710>

- Krimat, S., Metidji, H., Tigrine, C., Dahmane, D., Nouasri, A., & Dob, T. (2017). Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1134-z>
- Bauer, M., & Burgot, G. (2001). Analyse des solvants résiduels dans les produits pharmaceutiques. *Médicaments et Produits Pharmaceutiques*. <https://doi.org/10.51257/a-v2-p3260>
- Beuchat, L. R. (2017). Influence of Water Activity on Sporulation, Germination, Outgrowth, and Toxin Production. *Environmental Science, Biology*, 137-151. <https://doi.org/10.1201/9780203734148-7>
- Cruz, M., Antunes, P., Paulo, L., Ferreira, A. M., Cunha, A., Almeida-Aguiar, C., & Oliveira, R. (2016). Antioxidant and dual dose-dependent antigenotoxic and genotoxic properties of an ethanol extract of propolis. *RSC Advances*, 6(55), 49806-49816. <https://doi.org/10.1039/c6ra04856k>
- Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., & Mars, M. (2012). Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops And Products*, 40, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.045>
- Haimoud, S. A., Allem, R., Djefalland, K. B., & Lembarki, N. (2022). Évaluation in vitro et in vivo des activités biologiques des extraits de propolis et pollen. *Phytothérapie*, 20(1), 63-71. <https://doi.org/10.3166/phyto-2022-0302>
- Sreedevi, P., Vijayalakshmi, K., & Venkateswari, R. (2017). PHYTOCHEMICAL EVALUATION OF *PUNICA GRANATUM* L. LEAF EXTRACT. *International Journal Of Current Pharmaceutical Research*, 9(4), 14. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2017v9i4.1159>
- Yu, M., Gouvinhas, I., Rocha, J., & Barros, A. I. R. N. A. (2021). Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4>
- Zhang, H., Wang, M., Yu, G., Pu, J., Tian, K., Tang, X., Du, Y., Wu, H., Hu, J., Luo, X., Lin, L., & Deng, Q. (2023). Comparative analysis of the phenolic contents and antioxidant activities of different parts of two pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars : 'Tunisia' and 'Qingpi'. *Frontiers In Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1265018>
- Samira, M., Lahouaria, L., Noureddine, M., Wafa, T., Zouaoui, Z. B., Souad, S., Rawda, B., & Mohammed, B. (2019, 30 juin). Evaluation of bioactive properties and antioxidant capacity of native and imported pomegranate fruit bark (*Punica granatum*, L) cultivars found in Algeria. <https://www.ijrbs.in/index.php/ijrbs/article/view/160>

- Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *Journal Of Food Science And Technology*, 54(9), 2890-2901. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2727-0>.
- De Carvalho Rodrigues, V., Da Silva, M. V., Santos, A. R. D., Zielinski, A. A. F., & Haminiuk, C. W. I. (2015). Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. *International Journal Of Food Science & Technology*, 50(9), 2038-2045. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12858>.
- Gaspar, T., Penel, C., & Greppin, H. (2016). Approche analogique et réalités des phytohormones : des retards et des erreurs stratégiques ? *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 190-208. <https://doi.org/10.25518/0037-9565.6236>.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal Of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>.
- Mokgalaboni, K., Dlamini, S., Phoswa, W. N., Modjadji, P., & Lebelo, S. L. (2023a). The Impact of Punica granatum Linn and Its Derivatives on Oxidative Stress, Inflammation, and Endothelial Function in Diabetes Mellitus : Evidence from Preclinical and Clinical Studies. *Antioxidants*, 12(8), 1566. <https://doi.org/10.3390/antiox12081566>.
- Minutolo, A., Gismondi, A., Chirico, R., Di Marco, G., Petrone, V., Fanelli, M., D'Agostino, A., Canini, A., Grelli, S., Albanese, L., Centritto, M., Zabini, F., Matteucci, C., & Meneguzzo, F. (2023). Antioxidant Phytocomplexes Extracted from Pomegranate (Punica granatum L.) Using Hydrodynamic Cavitation Show Potential Anticancer Activity In Vitro. *Antioxidants*, 12(8), 1560. <https://doi.org/10.3390/antiox12081560>
- BenSaad, L. A., Kim, K. H., Quah, C. C., Kim, W. R., & Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A& ; B isolated from Punica granatum. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555>
- Mastrogiovanni, F., Mukhopadhyay, A., Lacetera, N., Ryan, M. T., Romani, A., Bernini, R., & Sweeney, T. (2019). Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extracts on In Vitro Human Intestinal Caco-2 Cells and Ex Vivo Porcine Colonic Tissue Explants. *Nutrients*, 11(3), 548. <https://doi.org/10.3390/nu11030548-0>
- Zhao, S., Ma, D., Zhu, Y., Zhao, J., Zhang, Y., Chen, J., & Sheng, Z. (2018). Antidiarrheal effect of bioactivity-guided fractions and bioactive components of pomegranate (Punica granatum L.) peels. *Neurogastroenterology & Motility*, 30(7). <https://doi.org/10.1111/nmo.13364>

Yaseen, A., Jamal, P., Amin, M., Haltas, H., Uthirapathy, S., Khadeer, M., & Basheer, A. (2023). Pomegranate Juice Attenuates Anti-ulcer in Indomethacin-induced Peptic Ulcer. *Journal Of Angiotherapy*, 7(1). <https://doi.org/10.25163/angiotherapy.719364>

De Freitas, K. S., Squarisi, I. S., Acésio, N. O., Nicolella, H. D., Ozelin, S. D., De Melo, M. R. S., Guissone, A. P. P., Fernandes, G., Silva, L. M., Da Silva Filho, A. A., & Tavares, D. C. (2020). Licochalcone A, a licorice flavonoid : antioxidant, cytotoxic, genotoxic, and chemopreventive potential. *Journal Of Toxicology And Environmental Health*, 83(21-22), 673-686. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1813228>

Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., & Van Huylenbroeck, J. (2010). Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tissue And Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 359-373. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>

Tsai, Y., Chen, P., & To, K. (2021). Induction of Polyploidy and Metabolic Profiling in the Medicinal Herb *Wedelia chinensis*. *Plants*, 10(6), 1232. <https://doi.org/10.3390/plants10061232>

Madani, H., Escrich, A., Hosseini, B., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A., & Palazon, J. (2021). Effect of Polyploidy Induction on Natural Metabolite Production in Medicinal Plants. *Biomolecules*, 11(6), 899. <https://doi.org/10.3390/biom11060899>

Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M., Hafiz, I., & Silvestri, C. (2019). Studies on Colchicine Induced Chromosome Doubling for Enhancement of Quality Traits in Ornamental Plants. *Plants*, 8(7), 194. <https://doi.org/10.3390/plants8070194>

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00065-8)

Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring : A review on its application. *Mutation Research/Reviews In Mutation Research*, 682(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.05.001>

Türkoğlu, Ş. (2006). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 626(1-2), 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.07.006>

- Launay, A. (2017). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales — cinquième édition J. Bruneton, Éditions Lavoisier Tec & ; Doc, 2016, 1 488 p, 195,00 € . Phytothérapie, 15(5), 316. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1173-5>
- Derbel, S., & Ghedira, K. (2005). Phytonutriments and their impact on health. Phytothérapie, 3(1), 28-34. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0061-6>
- Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts : A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. Journal Of Ethnopharmacology, 143(2), 397-405. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.004>
- Valero-Mendoza, A., Meléndez-Rentería, N., Chávez-González, M., Flores-Gallegos, A., Wong-Paz, J., Govea-Salas, M., Zugasti-Cruz, A., & Ascacio-Valdés, J. (2022). The whole pomegranate (*Punica granatum*. L), biological properties and important findings : A review. Food Chemistry Advances, 2, 100153. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100153>
- Akinboro, A., & Bakare, A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. Journal Of Ethnopharmacology, 112(3), 470-475. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.014>
- Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of Plant Secondary Metabolites. Methods In Molecular Biology, 341-366. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13
- Yi, T., Lo, H., Zhao, Z., Yu, Z., Yang, Z., & Chen, H. (2012). Comparison of the Chemical Composition and Pharmacological Effects of the Aqueous and Ethanolic Extracts from a Tibetan “Snow Lotus” (*Saussurea laniceps*) Herb. Molecules, 17(6), 7183-7194. <https://doi.org/10.3390/molecules17067183>
- Ng, Z. X., Samsuri, S. N., & Yong, P. H. (2020). The antioxidant index and chemometric analysis of tannin, flavonoid, and total phenolic extracted from medicinal plant foods with the solvents of different polarities. Journal Of Food Processing And Preservation, 44(9). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14680>
- Bekara, A., Hamadouche, N. A., Kahloula, K., Sadi, N., & Aoues, A. (2016). Etude phytochimique et activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L. DOAJ (DOAJ : Directory Of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/9ae2d33d86b64d9e8c1d86155c2ff8b4>
- Ochoa, H., & Raul, L. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné « solvant/actif » d'origine végétale. <https://oatao.univ-toulouse.fr/7399/>
- Abaza, L., Youssef, N. B., Manai, H., Haddada, F. M., Methenni, K., & Zarrouk, M. (2011). Chétoui olive leaf extracts : influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. Grasas Y Aceites, 62(1), 96-104. <https://doi.org/10.3989/gya.044710>
- Krimat, S., Metidji, H., Tigrine, C., Dahmane, D., Nouasri, A., & Dob, T. (2017). Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d'extrait

hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* Desf. Phytothérapie.
<https://doi.org/10.1007/s10298-017-1134-z>

Bauer, M., & Burgot, G. (2001). Analyse des solvants résiduels dans les produits pharmaceutiques. *Médicaments et Produits Pharmaceutiques*. <https://doi.org/10.51257/a-v2-p3260>

Beuchat, L. R. (2017). Influence of Water Activity on Sporulation, Germination, Outgrowth, and Toxin Production. *Environmental Science, Biology*, 137-151.
<https://doi.org/10.1201/9780203734148-7>

Cruz, M., Antunes, P., Paulo, L., Ferreira, A. M., Cunha, A., Almeida-Aguiar, C., & Oliveira, R. (2016). Antioxidant and dual dose-dependent antigenotoxic and genotoxic properties of an ethanol extract of propolis. *RSC Advances*, 6(55), 49806-49816.
<https://doi.org/10.1039/c6ra04856k>

Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., & Mars, M. (2012). Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops And Products*, 40, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.045>

Haimoud, S. A., Allem, R., Djefalland, K. B., & Lembarki, N. (2022). Évaluation in vitro et in vivo des activités biologiques des extraits de propolis et pollen. *Phytothérapie*, 20(1), 63-71.
<https://doi.org/10.3166/phyto-2022-0302>

Sreedevi, P., Vijayalakshmi, K., & Venkateswari, R. (2017). PHYTOCHEMICAL EVALUATION OF PUNICA GRANATUM L. LEAF EXTRACT. *International Journal Of Current Pharmaceutical Research*, 9(4), 14. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2017v9i4.1159>

Yu, M., Gouvins, I., Rocha, J., & Barros, A. I. R. N. A. (2021). Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4>

Zhang, H., Wang, M., Yu, G., Pu, J., Tian, K., Tang, X., Du, Y., Wu, H., Hu, J., Luo, X., Lin, L., & Deng, Q. (2023). Comparative analysis of the phenolic contents and antioxidant activities of different parts of two pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars : ‘Tunisia’ and ‘Qingpi’. *Frontiers In Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1265018>

Samira, M., Lahouaria, L., Noureddine, M., Wafa, T., Zouaoui, Z. B., Souad, S., Rawda, B., & Mohammed, B. (2019, 30 juin). Evaluation of bioactive properties and antioxidant capacity of native and imported pomegranate fruit bark (*Punica granatum*, L) cultivars found in Algeria. <https://www.ijrbs.in/index.php/ijrbs/article/view/160>

Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of

selected Tunisian pomegranate peels. *Journal Of Food Science And Technology*, 54(9), 2890-2901. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2727-0>.

De Carvalho Rodrigues, V., Da Silva, M. V., Santos, A. R. D., Zielinski, A. A. F., & Haminiuk, C. W. I. (2015). Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. *International Journal Of Food Science & Technology*, 50(9), 2038-2045. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12858>.

Gaspar, T., Penel, C., & Greppin, H. (2016). Approche analogique et réalités des phytohormones : des retards et des erreurs stratégiques ? *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 190-208. <https://doi.org/10.25518/0037-9565.6236>.

Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal Of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>.

Mokgalaboni, K., Dlamini, S., Phoswa, W. N., Modjadji, P., & Lebelo, S. L. (2023a). The Impact of *Punica granatum* Linn and Its Derivatives on Oxidative Stress, Inflammation, and Endothelial Function in Diabetes Mellitus : Evidence from Preclinical and Clinical Studies. *Antioxidants*, 12(8), 1566. <https://doi.org/10.3390/antiox12081566>.

Minutolo, A., Gismondi, A., Chirico, R., Di Marco, G., Petrone, V., Fanelli, M., D'Agostino, A., Canini, A., Grelli, S., Albanese, L., Centritto, M., Zabini, F., Matteucci, C., & Meneguzzo, F. (2023). Antioxidant Phytocomplexes Extracted from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Using Hydrodynamic Cavitation Show Potential Anticancer Activity In Vitro. *Antioxidants*, 12(8), 1560. <https://doi.org/10.3390/antiox12081560>

BenSaad, L. A., Kim, K. H., Quah, C. C., Kim, W. R., & Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A & B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555>

Mastrogiovanni, F., Mukhopadhyay, A., Lacetera, N., Ryan, M. T., Romani, A., Bernini, R., & Sweeney, T. (2019). Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extracts on In Vitro Human Intestinal Caco-2 Cells and Ex Vivo Porcine Colonic Tissue Explants. *Nutrients*, 11(3), 548. <https://doi.org/10.3390/nu11030548-0>

Zhao, S., Ma, D., Zhu, Y., Zhao, J., Zhang, Y., Chen, J., & Sheng, Z. (2018). Antidiarrheal effect of bioactivity-guided fractions and bioactive components of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. *Neurogastroenterology & Motility*, 30(7). <https://doi.org/10.1111/nmo.13364>

- Yaseen, A., Jamal, P., Amin, M., Haltas, H., Uthirapathy, S., Khadeer, M., & Basheer, A. (2023). Pomegranate Juice Attenuates Anti-ulcer in Indomethacin-induced Peptic Ulcer. *Journal Of Angiotherapy*, 7(1). <https://doi.org/10.25163/angiotherapy.719364>
- De Freitas, K. S., Squarisi, I. S., Acésio, N. O., Nicoletta, H. D., Ozelin, S. D., De Melo, M. R. S., Guissone, A. P. P., Fernandes, G., Silva, L. M., Da Silva Filho, A. A., & Tavares, D. C. (2020). Licochalcone A, a licorice flavonoid : antioxidant, cytotoxic, genotoxic, and chemopreventive potential. *Journal Of Toxicology And Environmental Health*, 83(21-22), 673-686. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1813228>
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., & Van Huylenbroeck, J. (2010). Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tissue And Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 359-373. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>
- Tsai, Y., Chen, P., & To, K. (2021). Induction of Polyploidy and Metabolic Profiling in the Medicinal Herb *Wedelia chinensis*. *Plants*, 10(6), 1232. <https://doi.org/10.3390/plants10061232>
- Madani, H., Escrich, A., Hosseini, B., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A., & Palazon, J. (2021). Effect of Polyploidy Induction on Natural Metabolite Production in Medicinal Plants. *Biomolecules*, 11(6), 899. <https://doi.org/10.3390/biom11060899>
- Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M., Hafiz, I., & Silvestri, C. (2019). Studies on Colchicine Induced Chromosome Doubling for Enhancement of Quality Traits in Ornamental Plants. *Plants*, 8(7), 194. <https://doi.org/10.3390/plants8070194>
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00065-8)
- Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). Allium cepa test in environmental monitoring : A review on its application. *Mutation Research/Reviews In Mutation Research*, 682(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.200>
- Türkoğlu, Ş. (2006). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 626(1-2), 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.07.006>

Dimitrijevic, J., Tomovic, M., Bradic, J., Petrovic, A., Jakovljevic, V., Andjic, M., Živković, J., Milošević, S. Đ., Simanic, I., & Dragicevic, N. (2024). *Punica granatum* L. (Pomegranate) Extracts and Their Effects on Healthy and Diseased Skin. *Pharmaceutics*, 16(4), 458. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16040458>

