الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère d'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى- جيجل-

Université Mohammed Seddik BenYahia -Jijel -

Faculté des Sciences de Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en : Biologie

Option : Biochimie

Thème

Evaluation de l'effet gastroprotecteur et anti-inflammatoire de l'acide gallique et de l'écorce de grenade (*Punica granatum*) contre l'ulcère induit par le Diclofénac chez le rat *albinos wistar*

Membres du Jury :

Présidente: Dr. BOUHAFS L.
Examinatrice : Dr. BENGUEDOUAR L.
Encadreur : Mme KEBSA W.

Réalisé par :

BOUCHICHA Messaouda
BOUNAMIS Sadjia

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Au terme de ce travail,

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus profonds tout d'abord au bon dieu le tout puissant de nous avoir accordé santé, courage volonté et surtout patience pour accomplir ce modeste travail.

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Mme* ***Kebsa,*** *d'avoir accepté d'être promotrice de ce mémoire. Nous la remercions pour son encadrement de qualité, sa disponibilité, et pour la confiance qu'elle nous a accordée tout en nous laissant libre dans notre choix. Nous la remercions ainsi pour ses pertinents conseils, ses orientations et pour les efforts qu'elle avait consentis avec beaucoup de sympathie et de patience, ce qui nous a permis de mener à terme ce projet.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury, Mme* ***Bouhafs*** *pour avoir accepté de présider le jury et évaluer notre travail. On remercie vivement D^re^* ***Benguedouar*** *pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Nous tenons à remercier Mr Makhtar, Melle Soraya Mme wided, Mme Hayet et également à toute l'équipe de laboratoire de Biochimie pour sa gentillesse, son aide, sa disponibilité tout le long de notre travail et surtout pour sa patience et ces conseils merci pour tout.

On tient à exprimer nos remerciements à tous les enseignants qui nous ont accompagnés durant tout le cursus universitaire.

A toute la promotion de master « Biochimie», année 2017-2018.

Enfin je remercie gracieusement toute personne qui a contribuée de près ou de loin à

la réalisation de ce travail

Merci

Liste des figures……..i
Liste des tableaux……...ii
Liste des abréviations……iii
Introduction 1

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : **Généralités sur l'estomac**

1. Anatomie ……2
2. Histologie ……....3
   2.1. Paroi gastrique…….....3
   2.2. Structures sécrétoires…….....4
3. Physiologie de la sécrétion acide……..5
   3.1. Mécanismes de la sécrétion acide…….5
   3.2. Mécanismes de contrôle de la sécrétion gastrique……...5
   3.3. Mécanismes de la protection de la muqueuse gastrique…….....7

Chapitre II : L'ulcère gastrique

1. Physiopathologie 8
2. Facteurs favorisant l'apparition de l'ulcère gastrique ……9
   2.1. Les Facteurs endogènes……9
   2.2. Les facteurs exogènes ……..9
      2.2.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens : Diclofénac de sodium ……..…...9
      2.2.2. Le stress psychologique……11
      2.2.3. L'infection à *l'Helicobacter pylori* ……12
      2.2.4. La consommation d'alcool ……..…….....12
3. Symptômes et complications……..13
4. Diagnostic…….....13
5. Traitements……...13

Chapitre III: Le grenadier *Punica granatum* et Acide gallique

1. Le grenadier : *Punica granatum*……..16
   1.1. Description botanique…….16
   1.2. Systématique……...16
   1.3. Composition chimique……...17
   1.4. Usages thérapeutiques et activités biologiques ……..17

1.5. Toxicité ……19
2. L'acide gallique……20
2.1. Pharmacocinétique ……...21
2.2. Biosynthèse ……..22
2.3. Activités pharmacologiques…….....22
2.4. Toxicité…….....25

Matériel et Méthodes

1. Etude phytochimique de *Punica granatum*……26
1.1. Préparation de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum*…….....26
1.2. Dosage des composés phénoliques……27
1.3. Analyse des extraits par CG-MS……...28
2. Etude *in vitro* de l'activité anti-radicallaire……....28
2.1. Activité anti-radicalaire par le test DPPH°……...28
2.2. Détermination du pouvoir réducteur (FRAP)……..29
3. Evaluation de l'effet gastro-protecteur de *Punica granatum* et de l'acide gallique ……..29
3.1. Entretien et traitement des animaux……..29
3.2. Le sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques……...29
3.3. Mesure des paramètres gastrique…….....30
3.3.1. Etude Macroscopique et détermination de l'indice d'ulcère…….....30
3.3.2. Mesure de l'acidité gastrique…….....31
3.3.3. Mesure de la production de mucus gastrique ……31
3.4. Préparation de la fraction cytosolique……..31
3.5. Dosage des protéines…….....31
3.6. Dosages tissulaires……32
3.6.1. Dosage du glutathion (GSH)……..32
3.6.2. Dosage du Malone-dialdéhyde (MDA)……..32
3.6.3. Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)……..32
3.6.4. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)…….....33
3.6.5. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathione peroxydase (GPx).....33
3.6.6. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathione-S-transférase (GST)…..34
3.7. Etude histologique ……34
4. Etude de l'activité anti-inflammatoire …….....……...35
5. Analyse statistique……....36

Résultats et discussion

1. Etude phyto-chimique de *Punica granatum*……37

1.1. Rendement d'extraction……...37

1.2. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et en tanins hydrolysables……..38

1.3. Identification des composants de l'extrait méthanolique et éthanolique de l'écorce de Punica granatum par CG-MS…….....39

2. Etude *in vitro* de l'activité anti-oxydante……...44

2.1. Effet anti-radicalaire contre le radical libre DPPH°…….44

2.2. Détermination du pouvoir réducteur (FRAP)……..46

3. Etude *in vivo* : Evaluation de l'effet gastro-protecteur……...48

3.1. Paramètres gastriques ……..48

3.1.1. Etude macroscopique…….....48

3.1.2. Indice d'ulcère et pourcentage de protection……..50

3.1.3. Productions de mucus…….....51

3.1.4. Volume de jus gastrique……..52

3.1.5. Acidité gastrique……...54

3.2. Evaluation de la CRP……...55

3.3. Evaluation du stress oxydant gastrique…….56

3.3.1. Dosage du glutathion……...56

3.3.2. Dosage du MDA……..57

3.3.3. Activité enzymatique de la SOD…….59

3.3.4. Activité enzymatique de la catalase……....60

3.3.5. Activité enzymatique de la glutathion peroxydase……..62

3.3.6. Activité enzymatique de glutathion S-transférase (GST)…….....63

3.4. Etude histologique microscopique……....64

4. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'EMEP et de l'acide gallique *in vivo*……...66

Conclusion……70

Référence Bibliographique…….....72

Annexe

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure 1	Anatomie de l'estomac.	2
Figure 2	Tuniques de la paroi gastrique.	3
Figure 3	Différentes cellules sécrétoires composant la muqueuse gastrique.	4
Figure 4	Mécanisme de la formation de l'HCl par les cellules pariétales.	5
Figure 5	Mécanismes de contrôle de la sécrétion gastrique.	6
Figure 6	Ulcèration de la muqueuse gastrique.	8
Figure 7	Mécanisme d'action simplifié des AINS.	11
Figure 8	Réponses physiologiques de l'axe hypothalamo-hypophyso- surrénalien aux facteurs de stress.	12
Figure 9	Différentes parties de grenadier.	16
Figure 10	Différentes classes de polyphénols et leurs sources connues de plantes et de fruits.	20
Figure 11	Structure chimique de l'acide gallique.	21
Figure 12	Voies possibles pour la biosynthèse de l'acide gallique.	22
Figure 13	Mécanisme de formation d'ERO par l'acide gallique.	25
Figure 14	Ecorces et poudre de grenade (*Punica grantum*).	26
Figure 15	Les étapes d'extraction de l'écores de grenade (*Punica granatum*).	27
Figure 16	Teneur en polyphénols, tanins hydrolysables et flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* en mg EAG/g et mg EQ /g et mg EAT/g de *Punica grantum*.	37
Figure 17	Chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'écorce de fruit de *Punica granatum*.	40
Figure 18	Chromatogramme de l'extrait éthanolique de l'écorce de fruit de *Punica granatum*.	42
Figure 19	Pourcentage de réduction du radical libre DPPH° par l'EMEP, l'acide gallique et l'acide ascorbique à différents concentrations.	44

Figure 20	Pouvoir réducteur de l'acide gallique, l'EMEP et de l'acide ascorbique à différentes concentration.	47
Figure 21	Macroscopie des estomacs des rats.	49
Figure 22	Production de mucus chez les rats traités par le diclofénac seul ou en cas de prétraitement par EMEP, acide gallique (100mg/kg) et oméprazole (20mg/kg).	51
Figure 23	Volume de jus gastrique, chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique à (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg).	53
Figure 24	Variation des taux du GSH gastrique après traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg).	56
Figure 25	Variation des taux du MDA cytosolique après traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg).	58
Figure 26	Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu gastrique, après le traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg), et en cas de prétraitement par l'EMEP (100 mg/kg), l'AG (100mg/kg) et l'oméprazole (20mg/kg).	59
Figure 27	Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) dans le tissu gastrique après traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg).	61
Figure 28	Variation de l'activité enzymatique de la GPx dans le tissu gastrique après le traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg).	62
Figure 29	Figure 29. Variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique gastrique après une dose de diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg).	64
Figure 30	Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine des tissus gastriques (×40).	65

Figure 31	Effet de diclofénac, de l'EMEP et de l'acide gallique sur le volume de l'œdème induit par la carragénine (mm).	66
Figure 32	Pourcentage d'inhibition de l'inflammation induite par la carragénine à 1% après traitement par le diclofénac (12 mg/kg), l'acide gallique et l'EMEP à la dose de 200 mg/kg.	67

Liste des Tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Paramètres pharmacocinétiques du diclofénac.	10
Tableau 2	Classification des principaux médicaments antiulcéreux.	14
Tableau 3	Paramètres pharmacocinétiques d'oméprazole.	15
Tableau 4	Systématique de la plante *Punica granatum*.	16
Tableau 5	Principaux constituants des différentes parties du grenadier.	17
Tableau 6	Rendement d'extraction de l'extrait méthanolique de *Punica granatum.*	37
Tableau 7	Composition de l'extrait méthanolique des écorces de *Punica granatum* après analyse par CG-MS.	41
Tableau 8	Composition chimique de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Punica granatum* après analyse par CG-MS.	43
Tableau 9	IC50 de l'EMEP, DE l'acide gallique et de l'acide ascorbique contre le radical DPPH°.	45
Tableau 10	Indice d'ulcère et pourcentage de protection chez les rats traités par le diclofénac seul ou en cas de prétraitement par l'EMEP, l'acide gallique (100mg/kg) et l'oméprazole (20mg/kg).	50
Tableau 11	Variations de l'acidité chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique à (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg).	54
Tableau 12	Variations des taux de la CRP chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg).	55

Liste des Abréviations

AG : Acide Gallique.

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdienne.

BSA : Albumine Sérique Bovin.

CAT: Catalase.

DCF : Diclofénac.

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazl.

EMEP : Extrait méthanolique de l'écorce de *Punica*.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power.

GPx : Glutathion péroxydase.

GSH : Glutathion.

GST : Glutathione-S-transférase.

HCl : acide chlorhydrique.

HP : *Helicobacter pylori*.

IC50 : Concentration inhibitrice 50.

IPP : Inhibiteur de la pompe à proton.

MDA : malone-dialdéhyde.

NOAEL : No Observable Adverse Effect Level.

OME : Oméprazole.

SOD : Superoxyde dismutase.

UG : Ulcère gastrique.

Introduction

L'ulcère gastrique (UG) est l'une des principales maladies gastro-intestinales qui survient à la surface de la muqueuse gastrique. C'est une sorte de nécrose tissulaire locale à cause de la formation de lésions ulcéreuses. Il se définit comme une perte de substance de la paroi gastrique atteignant en profondeur la musculeuse. L'UG résulte du déséquilibre entre l'agression chlorhydro-peptique et les mécanismes de défense en un point précis de la muqueuse (Shen et *al*., 2017). Ces dernières années, l'incidence de l'ulcère gastrique augmente en raison de nombreux facteurs nuisibles tels que le tabagisme, l'infection par l'*Helicobacter pylori*e, la consommation excessive d'alcool et du café, le stress, la mauvaise alimentation et l'ingestion à long terme des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Boccellato et *al*., 2018). Des concentrations élevées en AINS, tels que l'aspirine et le diclofénac (DCF), peuvent modifier la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui peut entraîner un œdème, une dégénérescence et des nécroses de la muqueuse gastrique (Goswami et *al*., 2017).

Actuellement, les médicaments les plus couramment utilisés dans le traitement de l'UG sont les inhibiteurs de la pompe à protons. Cependant, les effets secondaires associés, tels que: l'hypersensibilité, arythmie, impuissance, gynécomastie, changements hématopoïétiques et la récurrence de l'UG après traitement sont considérables (Kangwan et *al*., 2014). Ainsi, il est encore nécessaire de chercher de nouvelles molécules naturelles à activité antiulcéreuse moins toxiques et plus efficaces par rapport aux médicaments de synthèse.

L'utilisation médicale de la grenade remonte à plus de 3 000 ans mais ce n'est que très récemment que l'on a redécouvert son efficacité à prévenir toute une série de pathologies potentiellement mortelles. En médecine traditionnelle: l'écorce de grenade, est souvent utilisée contre les ulcères gastriques, les vers intestinaux et les brulures. Comme puissant antioxydant, la grenade contient une grande variété de flavonoïdes et de tanins hydrolysables qui sont responsables de plus de 85% de leur activité anti-oxydante (Jurenka, 2008 ; Jacinto, 2018). La présente étude s'est concentrée pour la première fois sur les actions protectrices de l'écorce de la grenade et de l'acide gallique contre l'ulcère gastrique induit par le diclofénac. Le but ultime de cette étude est :

- L'étude phytochimique des extraits de l'écorce de *Punica granatum.*
- Evaluation de l'état de stress oxydant cellulaire lors d'un ulcère gastrique induit par le DCF.
- Evaluation de l'effet gastroprotecteur de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* (EMEP) et de l'acide gallique contre l'ulcère gastrique induit par le diclofénac.
- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'EMEP et de l'acide gallique et détermination des mécanismes d'actions responsables de leurs activités antiulcéreuses.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur l'estomac

1. Anatomie

L'estomac est un segment dilaté du tube digestif, un organe creux en forme de J, qui permet le stockage et la digestion du bol alimentaire provenant de l'œsophage. Il se localise dans la partie haute de l'abdomen, sous le diaphragme, en contact avec le lobe gauche du foie. Il est maintenu dans la cavité abdominale par des ligaments rattachés au foie, au diaphragme et à la rate (Mutter et Marescaux, 2001). L'estomac est la partie la plus large du tube digestif. A jeun il a 25 cm de long sur 10 cm de large chez l'homme (Chevrel, 1991). Sur le plan anatomique l'estomac est constitué de plusieurs parties **(Figure 1)** :

- **Le cardia** : C'est la région entourant l'orifice du cardia par lequel la nourriture provenant de l'œsophage pénètre dans l'estomac (Marieb et Hoehn, 2010).

- **Le fundus** : C'est la région situé au-dessus de l'orifice du cardia (Drake et *al*., 2012).

- **Le corps** : C'est la partie centrale de l'estomac qu'elle est délimitée par la grande courbure (bord gauche de l'estomac) et la petite courbure (bord droit de l'estomac). Il constitue la majeure partie de l'estomac, localisée entre le fundus et l'antre (Palier et *al*., 2012).

- **L'antre** : Portion terminale de l'estomac, terminée par le pylore qui régit l'évacuation gastrique via le muscle sphincter pylorique (Elaine et Marieb, 2008).

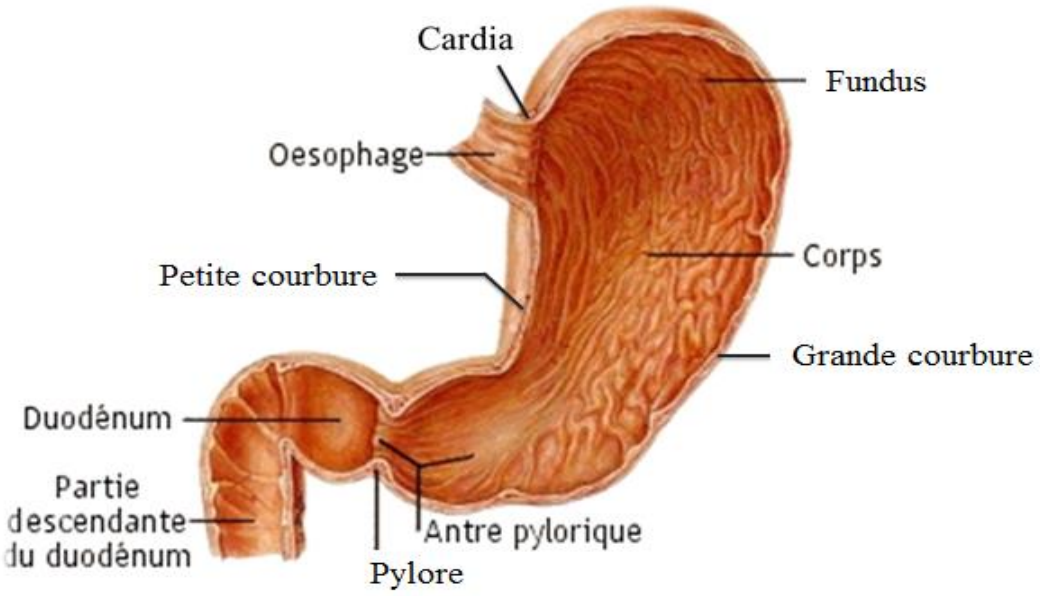


Figure 1. *Anatomie de l'estomac (Asselah, 2013).*

2. Histologie

2.1. Paroi gastrique

Les fonctions de l'estomac sont assurées par les composants de sa paroi. La paroi gastrique a une épaisseur moyenne de 5 mm et se constitue de l'intérieur vers l'extérieur par la superposition de la muqueuse, d'une sous muqueuse, d'une musculeuse et d'une séreuse (Bado et sobhani, 2011) **(Figure 2)**.

- **Muqueuse** : C'est la couche la plus profond, est une membrane humide qui tapisse la cavité, ou lumière de l'organe (Elaine et Marieb, 2008). Elle est constituée par un épithélium de recouvrement dont la surface est parsemée de nombreuses cryptes glandulaires (Marieb, 1999).

- **Sous-muqueuse** : C'est un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Dans la sous-muqueuse se trouve le plexus nerveux de Meissner. Ce pacemaker contient autant de neurones que la moelle épinière et donne au tube digestif la possibilité de régler dans une large mesure son propre fonctionnement (Laurent et Sokol, 2014).

- **La musculeuse** : Composée de trois couches de fibres musculaires, l'une «externe» à fibres longitudinales, l'autre «interne» à fibres circulaires (formant un sphincter), et aussi une couche moyenne à fibres obliques (Putz et Pabst, 2006).

- **Séreuse (péritoine)** : Est la tunique externe de la paroi. Elle est formée de tissu conjonctif lâche recouvrant d'une seule couche de cellules aplaties et composant le péritoine viscéral (Marieb, 2000).

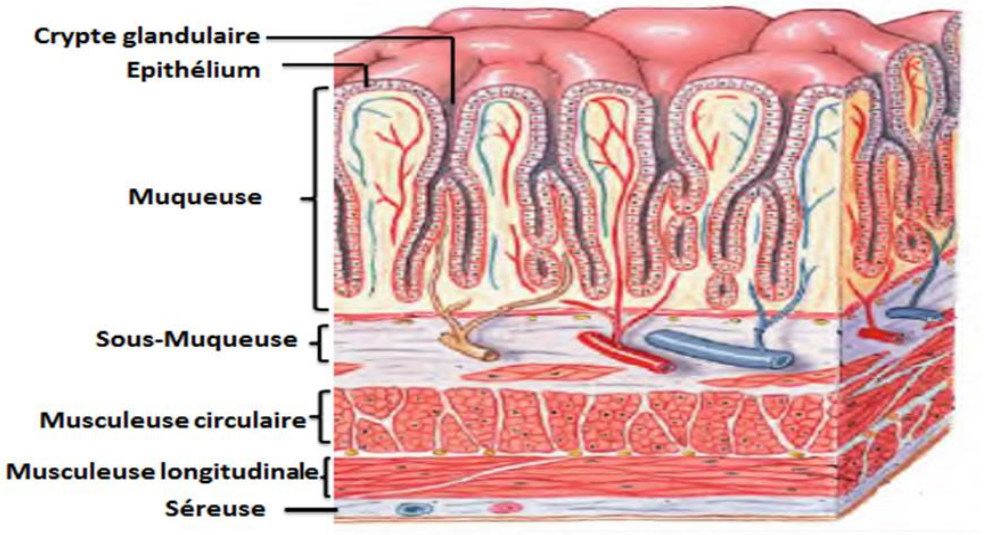


Figure 2. *Tuniques de la paroi gastrique (Chevallier, 1998).*

2.2. Structures sécrétoires

La muqueuse gastrique renferme les glandes sécrétoires, qui diffèrent selon la localisation au sein de l'estomac (Laurent et Harry, 2014) **(Figure 3)**.

Les glandes fundiques : Elles sont composées de quatre types de cellules différentes:

- **Les cellules principales** : Elles sont petites, polyédriques et prédominent au milieu et au fond des glandes, elles produisent le pepsinogène (Marieb et Hoehn, 2014).
- **Les cellules pariétales** : Appelées aussi cellules bordantes ou oxyntiques, sont situées dans la région apicale des glandes, responsables de la sécrétion de l'acide chlorhydrique (HCL) et le facteur intrinsèque (petite glycoprotéine indispensable à l'absorption de la vitamine B12) (Marieb et Hoehn, 2014).
- **Les cellules à mucus** : Situées essentiellement au niveau du collet des glandes et dans leurs régions plus basales, elles produisent le mucus et le bicarbonate (Marieb et Hoehn, 2014).
- **Les cellules endocrines** : Comprennent les cellules G (sécrétant la gastrine), présentes uniquement dans les glandes pyloriques et les cellules D à somatostatine (Ader et *al.*, 2006) et les cellules entérochromaffines-like (ECL) sécrétant l'histamine (Bado et Sobhani, 2011).

Les glandes pyloriques : Elle présente des cryptes étroites et profondes avec des glandes tubulaires contournées, qui sont essentiellement constituées par les cellules à mucus qui vont former un revêtement continu de mucus et les cellules endocrines (Belon et Lacour, 2015).

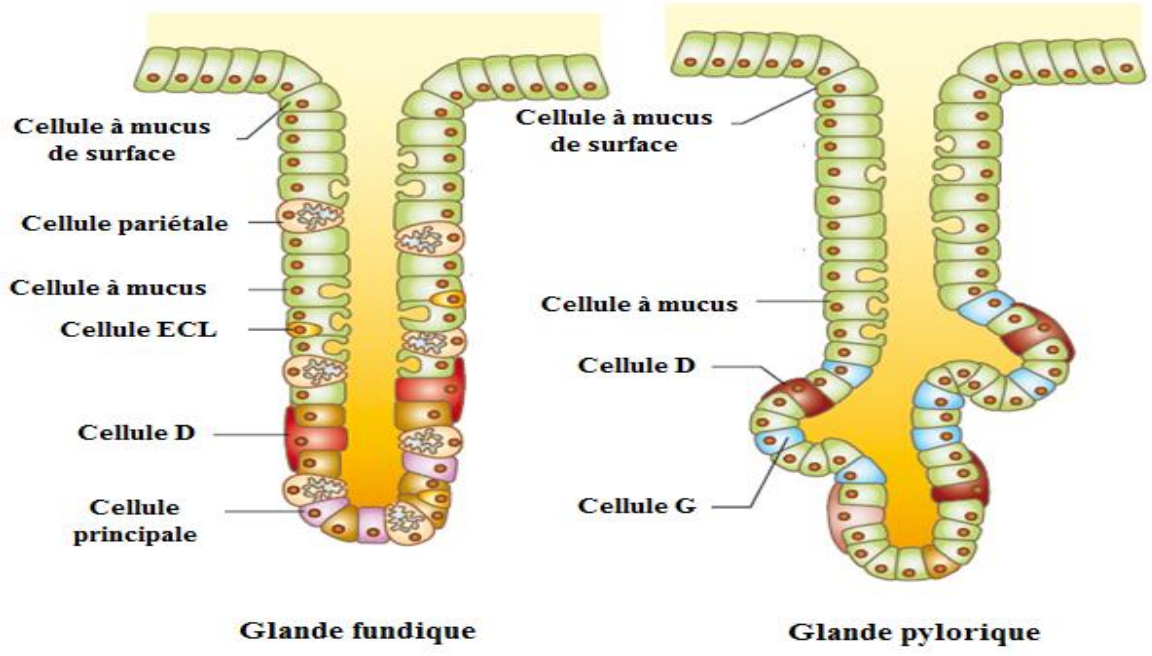


Figure 3. *Différentes cellules sécrétoires composant la muqueuse gastrique (Bado et Sobhani, 2011).*

3. Physiologie de la sécrétion acide

Notre estomac sécrète chaque jour deux à trois litres d'une solution concentrée d'acide chlorhydrique. Cette sécrétion acide est le fait de cellules appelées pariétales ou bordantes, situées principalement au niveau du collet des tubes glandulaires de l'épithélium fundique, dans la partie supérieure de l'estomac (lto, 1981).

3.1. Mécanismes de la sécrétion acide

La sécrétion de l'acide chlorhydrique (HCl) se fait sous l'action d'une H^+/K^+ ATPase ou pompe à proton exprimées sur la face luminale des canalicules des cellules pariétales (Ader et *al*., 2006). Ces cellules possèdent l'anhydrase carbonique qui catalyse la combinaison de CO_2 provenant du métabolisme cellulaire et de l'H_2O pour former $H_2CO_3^-$ (Lefrançois et Tiret, 2000). La sécrétion des ions H^+ s'effectue grâce à l'activité ATPasique de la pompe à proton, qui échange un ion H^+ cytoplasmique contre un ion K^+ venant de la lumière gastrique. Cet échange s'accompagne de la libération d'un ion Cl^- formant l'acide chlorhydrique qui est déversé dans la lumière gastrique (Kirkiacharion, 2010). A la membrane basolatéralel'HCO_3^- passe dans le sang grâce à un échangeur Cl^-/HCO_3^- **(Figure 4)**. Ces bicarbonates sont responsables d'une alcalinisation du sang après un repas (Lefrançois et Tiret, 2000).

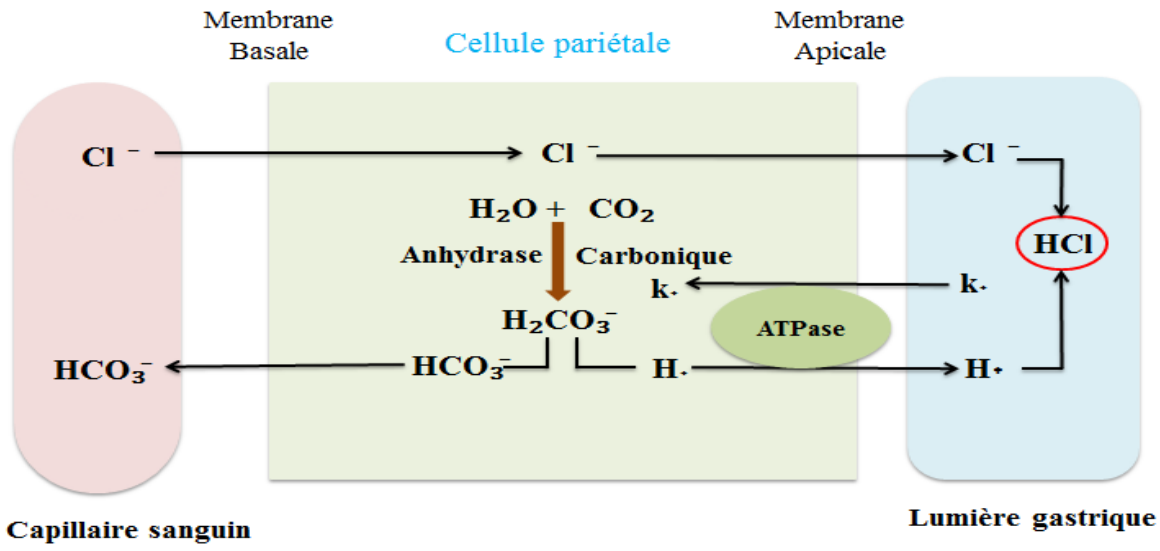


Figure 4. *Mécanisme de la formation de l'HCl par les cellules pariétales (Marieb et Hoehen, 2010).*

3.2. Mécanismes de contrôle de la sécrétion gastrique

La sécrétion gastrique est continue, elle est contrôlée par un mécanisme conjoint neuro- hormonal comportant à la fois des agents de stimulation (gastrine, histamine, acétylcholine) et d'autres d'inhibition (somatostatines) (Beaugerie et *al*., 2014).

3.2.1. Le contrôle nerveux

Il emprunte la voie des nerfs pneumogastriques qui transmettent les excitations sensorielles et psychiques (sécrétion déclenchée par le goût, l'odeur, la vue d'un aliment). La stimulation nerveuse entraîne une réponse sécrétoire riche en acide chlorhydrique; c'est d'ailleurs la raison pour laquelle on peut ressentir les douleurs abdominales si, après on ne mange pas quelque chose (Lacombe, 2007). Par ailleurs le contrôle de la sécrétion acide des cellules pariétales est principalement assuré par le nerf vague (Keith et Arthur, 2006). La stimulation du nerf vague entraîne une sécrétion riche en pepsine et en Chlorure d'hydrogène (HCl).

3.2.2. Le contrôle hormonal

Il est assuré par plusieurs hormones : l'acétylcholine, l'histamine et la gastrine qui est l'hormone principale. Sa sécrétion est déclenchée et influencée par des facteurs locaux. Le contact des aliments, distension de l'antre et nature des aliments (alcool, viande). La présence d'aliment entraine à partir de la muqueuse de l'antre pylorique la libération d'une hormone, la gastrine qui stimule les cellules bordantes du corps de l'estomac (Samsong, 1980). Cette hormone entraine une sécrétion gastrique très acide mais pauvre en pepsine. La gastrine, l'acétylcholine et l'histamine stimulent la sécrétion acide de façon directe en activant leurs récepteurs respectifs de la cellule pariétale et de façon indirecte en augmentant la libération d'histamine à partir des cellules entérochromaffines-like (EC-L) **(**Boron et Boulpaep, 2009) **(Figure 5)**.

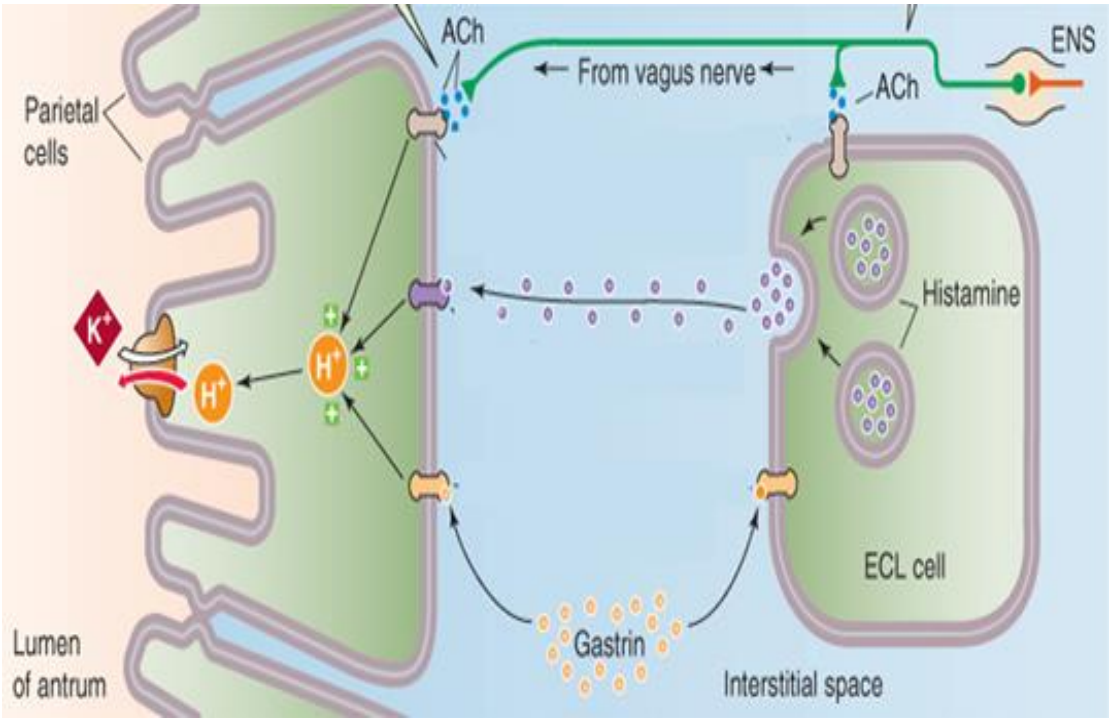


Figure 5*. Mécanismes de contrôle de la sécrétion gastrique* ***(****Boron et Boulpaep, 2009).*

3.3. Mécanismes de protection de la muqueuse gastrique

La muqueuse gastrique crée une barrière pour se protéger de l'érosion de suc gastrique, car elle est soumise à des conditions chimiques très durs (Pocock et Richards, 2004), et cela est assurer par plusieurs mécanismes; les principales protections locales sont :

3.3.1. Le mucus : A la surface de l'épithélium gastrique et duodénal, une couche de mucus est présente. Elle a pour but de diminuer la diffusion des ions H^+ vers la lumière gastrique et duodénale. Le gel de mucus est constitué de 67% de glycoprotéines sous forme de polymères. Lors d'ulcère, le gel de mucus est plus faible, la proportion de glycoprotéines diminue et ainsi la barrière de mucus perd sa capacité de diminuer la rétrodiffusion des ions H^+ (Bouarioua et *al*., 2007).

3.3.2. Le bicarbonate : Il est sécrété par les cellules à mucus, participant à la défense de la muqueuse gastrique contre l'acidité gastrique, la sécrétion des bicarbonates est fortement stimulée par les prostaglandines qui ont un rôle cytoprotecteur (Bado et Sobhani, 2011).

3.3.3. Le flux sanguin : Il est essentiel pour fournir les nutriments, de l'oxygène aux cellules, mais aussi pour évacuer les ions hydrogènes résiduels (Silbernalg et Lang, 2012).

3.3.4. Le renouvellement cellulaire : Les cellules épithéliales superficielles doivent se renouveler continuellement pour maintenir l'intégralité du revêtement, l'épithélium empêche l'entrée des ions H+ et les refoule en dehors de la muqueuse (Vander, 2001).

3.3.5. Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des dérivés de l'acide arachidonique (Lefebvre, 1975), la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines se fait par les cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX1 et COX2) (Perlemuter et *al.*, 2011).

- **COX1** : Constitutives, sont présentes dans presque tous les types cellulaires, sont exprimées de façon basale. Dans l'estomac, elles permettent la sécrétion de prostaglandines responsables de la protection gastrique.
- **COX2** : Elles sont produites quand il y a une agression (entorse, infection) et elles participent à des réactions inflammatoires (phénomène douloureux).

Les prostaglandines interviennent dans de nombreux mécanismes physiopathologiques (inflammation et douleurs) d'autres sont pourvues de plusieurs effets biologiques, les plus importants sont la diminution de la sécrétion acide et l'augmentation de la sécrétion du mucus (Jolliet et *al*., 2006).

Chapitre II : Ulcère gastrique

1. Physiopathologie

L'ulcère gastrique est une lésion nécrotique profonde, impliquant toute la profondeur de la muqueuse et la musculeuse, caractérisé par la perte des substances au niveau gastrique allant jusqu'à la destruction de la muqueuse et la mise à nue de la musculeuse **(figure 6)** (Zeitoun et *al.*., 2014). L'ulcère gastrique est une maladie fréquente, dont l'étiologie est multifactorielle (Saha et *al*., 2016). La physiopathologie de ce trouble est considérée comme un déséquilibre net entre les facteurs défensifs muqueux tels que le bicarbonate, la prostaglandine, les facteurs de croissance et les facteurs offensifs tels que les acides et les pepsines (Agrawal et *al*., 2000). Il est généralement accompagné avec des douleurs à l'abdomen. Ces douleurs proviennent du contact entre l'acide secrété et les plaies ou les ulcérations. Ces lésions s'accompagnent souvent d'une inflammation de la muqueuse (Samsong, 1980). Selon la profondeur de la lésion, on peut avoir :

- **Une abrasion** : C'est une destruction de l'épithélium et de la partie superficielle des cryptes.
- **Une érosion** : C'est une perte de substances pariétales à bords nets, taillée à fond inflammatoire non scléreux avec amputation de la musculaire muqueuse et de la sous muqueuse. Lorsque l'érosion touche les artères, il en résulte une hémorragie qui peut être mortelle.
- **Un ulcère vrai** : C'est une perte de substances amputant la musculeuse qui se trouve transformée en bloc scléreux (Rambaud, 2000 ; Keith et Arthur, 2006).

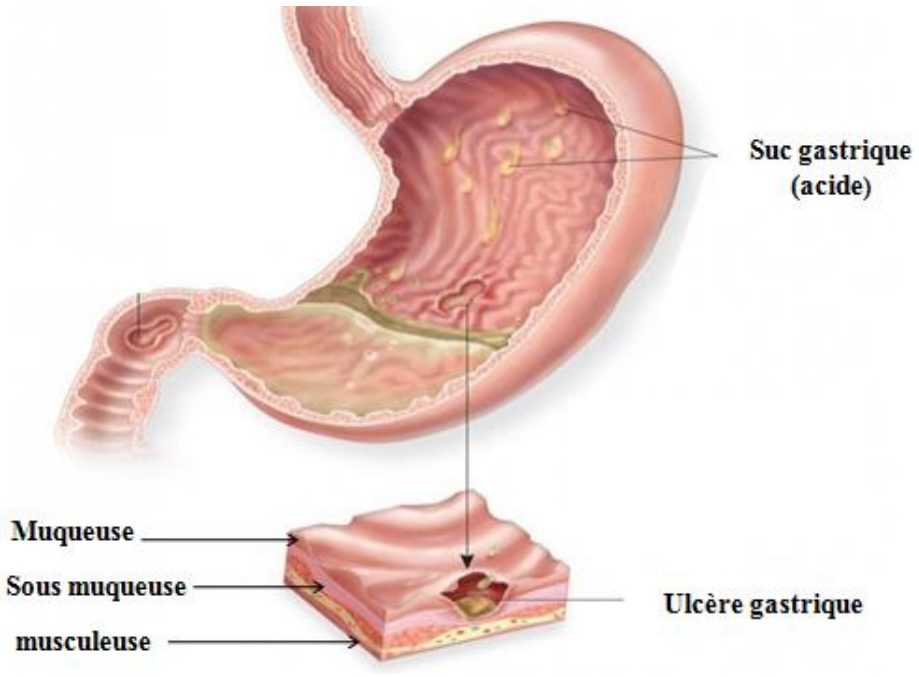


Figure 6. *Ulcèration de la muqueuse gastrique (Carolyn et al., 2008).*

2. Facteurs favorisants l'apparition de l'ulcère gastrique

2.1. Facteurs endogènes

De nombreux facteurs génétiques, neuronaux et hormonaux ont été postulés pour avoir des rôles dans le développement de l'ulcère (Soreide et *al*., 2015). L'ulcère gastrique résulte d'un déséquilibre entre l'agression acide de la sécrétion gastrique et les mécanismes de défense qui sont la barrière muqueuse constituée par le mucus, la sécrétion de bicarbonates, les phospholipides, les cellules épithéliales (cellules de surface) et sous-épithéliales (qui contiennent le flux sanguin muqueux) et les prostaglandines qui sont synthétisées en permanence dans la muqueuse stimulant ces mécanismes de protection (Soreide et *al*., 2015).

2.2. Facteurs exogènes

Plusieurs facteurs exogènes peuvent favoriser le déclanchement de l'ulcère gastrique, les plus fréquents sont les suivants :

2.2.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens: Diclofénac de Sodium

Les Anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments symptomatiques prescrits pour leur effet anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique, c'est la classe des médicaments la plus consommée par la population car elle ne nécessite pas une prescription médicale. De ce fait, elles sont la cause la plus fréquente d'ulcération. Les AINS ont des propriétés inhibitrices, inhibent la cyclo-oxygénase (COX1 et COX 2) qui est un médiateur principalement impliqué dans la synthèse de prostaglandine (PG) et de la thromboxane (A2) **(**Blain, 2000). L'aspirine, Ibuprofène, indométacine et le diclofénac sont les AINS les plus utilisés (Perlemuter et *al.*, 2011).

Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien dérivé de l'acide anilino-phénylacétique $C_{14}H_{11}NO_2$ (Cohen et Jacquot, 2001). Il est largement diffusé dans la pharmacopée mondiale sous diverses appellations (Medan, 2004). DCF un puissant inhibiteur de la cyclo-oxygénase ayant des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. Il est recommandé dans les pathologies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite chronique et l'arthrose, ainsi que dans le traitement des douleurs aiguës musculo-squelettiques (Katzung, 1998). Il est souvent prescrit comme analgésique dans le traitement des maladies rhumatismales (Lechon et *al*., 2003 ; Naisbitt et *al*., 2007).

Le diclofénac est contre-indiqué dans l'ulcère gastrique et chez les sujets allergiques sensibilisés par l'aspirine ou d'autres inhibiteurs de la prostaglandine synthéase (Cohen et Jacquot, 2001).

- **Pharmacocinétique**

Après administration par voie orale, le diclofénac est rapidement absorbé (Davies et Anderson, 1997). Le pic plasmatique est atteint entre 2 à 3 h et 99 % du principe actif circulant sont fixés sur les protéines plasmatiques. Son principal métabolite, est le 4'-hydroxydiclofénac, qui est connu pour conserver de faibles activités anti-inflammatoires et analgésiques (Fowler et *al*., 1983). Après biotransformation en glucoroconjugués et en métabolites sulfatés, le diclofénac est excrété dans les urines (65%) ou dans la bille (35%) après un temps de demi-vie ½ de 1 à 2h. Les paramètres pharmacocinétique de DCF sont résumés dans **le tableau 1** ci- dessous (Todd et Sorkin, 1988).

Tableau 1. *Paramètres pharmacocinétique de diclofénac (Hardman et limbird, 1998).*

Médicament	Absorption	Distribution	Métabolisme	Elimination	Temps ½ vie
Diclofénac	- Pic de concentration plasmatique 2 à 3h après administration orale.	- 99% de liaisons aux protéines plasmatiques	- 1ère passage hépatique très important 50% - Métabolisme hépatique par le cytochrome P450.	- 65% urinaire - 35% biliaire	- 1 à 2 h

- **Mécanismes de toxicité gastrique**

Comme les autres AINS, le diclofénac est associé à de graves effets indésirables gastro-intestinaux (Roy et *al*., 2015). Leur toxicité gastrique est due principalement à la diminution de la synthèse des prostaglandines qui jouent un rôle important dans le maintien de la barrière muqueuse, mais également à des mécanismes vasculaires (Zeitoun et *al*., 2014). Les effets indésirables gastro-intestinaux apparaissent en raison de la réduction de la synthèse des prostanoïdes, limitant la sécrétion de mucus et de bicarbonate qui protègent la muqueuse gastrique contre les lésions (Sinha et *al*., 2013).

La toxicité gastro-intestinale de cet agent dépend des taux élevés de diclofénac dans la circulation générale et la diminution des produits du métabolisme de l'acide arachidonique médié par la COX-2 dans les cellules endothéliales vasculaires, qui joue un rôle physiologique dans la protection du mucus en tant que puissant vasodilatateur et inhibiteur plaquettaire. Le mécanisme d'action des AINS est illustré dans **la figure 7** (Kearney et *al*., 2006; Patrignani et *al*., 2011).

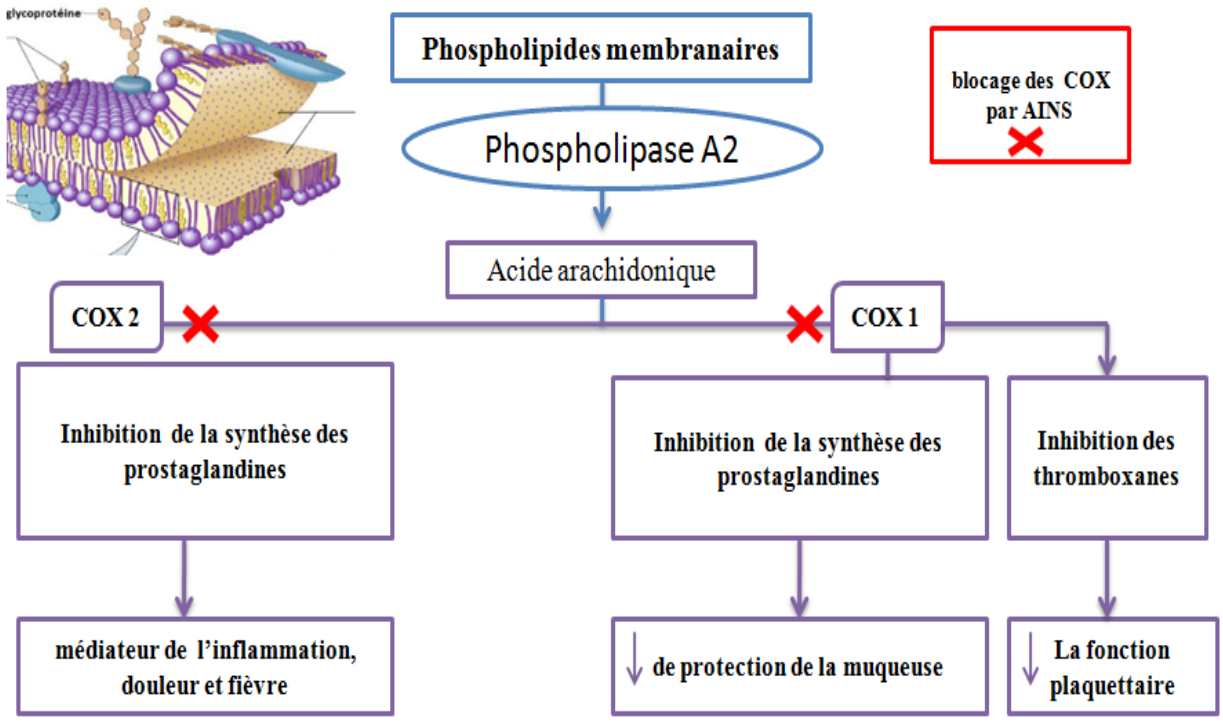


Figure 7. *Mécanisme d'action simplifié des AINS (Moulin et Coquerel, 2002; Perlemuet et al., 2011).*

2.2.2. Stress physiologique

Il est bien connu que les espèces réactives à l'oxygène (ERO) sont impliqués dans l'étiopathogénie des lésions ulcéreuses qui peuvent être la cause du développement de troubles organiques gastriques tels que la gastrite, les ulcères gastriques et le cancer gastrique, ainsi que des troubles fonctionnels tels que la dyspepsie fonctionnelle (Mezdour et *al.*, 2017). Les réponses physiologiques aux facteurs de stress comprennent une augmentation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ainsi que des changements dans le tissu gastro-intestinal. Selon la formulation de Selye du syndrome général d'adaptation, une augmentation de l'activité adrénocorticale est liée à une augmentation de l'incidence de l'ulcération gastrique **(figure 8)**.

Le principal responsable des ulcères de stress est le stress oxydant (Suzuki et *al.*, 2009). Il a été prouvé que le stress psychologique conduit à un stress oxydant dans l'estomac. Ce dernier est défini comme un déséquilibre de la balance antioxydant et pro-oxydant en faveur des ERO qui résulte, soit une production supplémentaire des ERO, soit une diminution des facteurs de défense antioxydants. Le stress oxydant n'est pas seulement impliqué dans la pathogénie de l'inflammation gastrique et l'ulcérogénèse mais aussi dans celle des maladies liées au mode de vie y compris l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète, les cardiopathies et les tumeurs malignes (Suzuki et *al.*, 2011).

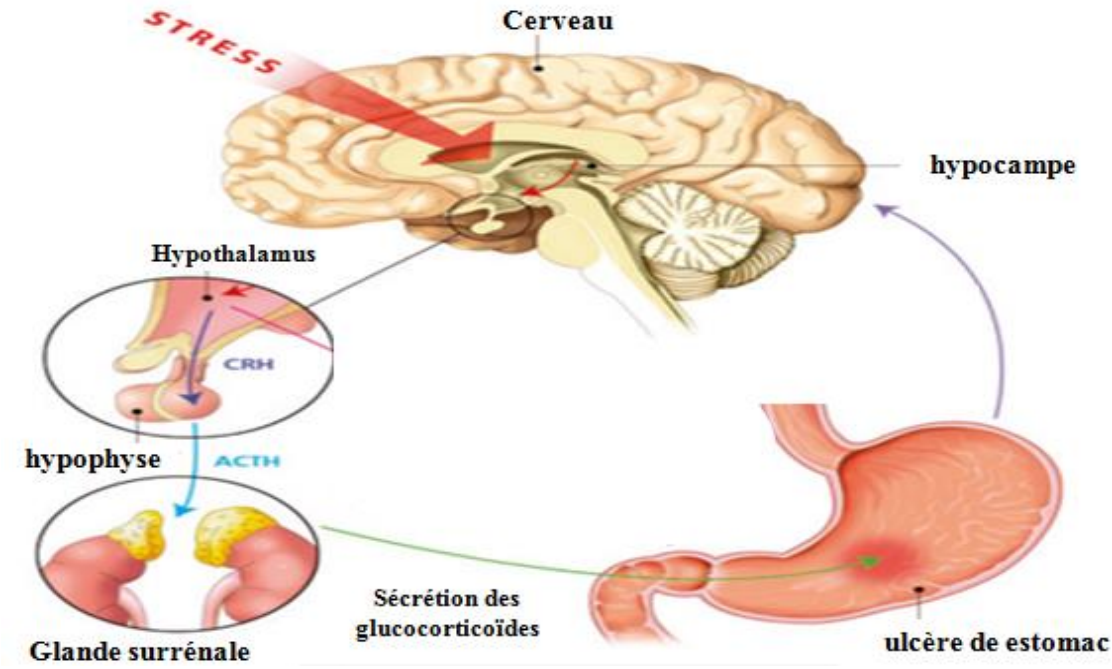


Figure 8. *Réponses physiologiques de l'axe hypothalamo-hypophyso surrénalien aux facteurs de stress (Suzuki et al., 2009) avec quelques modifications.*

2.2.3. *Helicobacter pylori Hp*

*Helicobacter pylori*e est une bactérie spirale, bacille à gram négative. Elle a une capacité unique à coloniser de façon persistante l'environnement extrêmement acide de l'estomac et à provoquer une inflammation (Grasso et *al*., 1996). Sa pathogénicité résulte de son pouvoir d'entraîner des lésions de la muqueuse gastrique à cause d'une réponse inflammatoire persistante et une dérégulation de la sécrétion des acides gastrique (shona et *al*., 2003 ; Barry et *al*., 2005). Les facteurs qui contribuent à l'inflammation gastrique par *HP* incluent :

- La mobilité de *l'HP* grâce à la présence des flagelles polaires engainés à sa surface l'adhérence de l'organisme à la muqueuse gastrique (Besnard et *al*., 2000).

- La production d'uréase par *l'HP* est indispensable pour la colonisation de la muqueuse gastrique. L'uréase joue un rôle essentiel dans la protection de la bactérie contre l'acidité gastrique (Scherer, 1996). De plus, *HP* conduit à la production d'ammoniaque et de bicarbonate qui neutralise le microenvironnement de la bactérie et lui permet ainsi de rester viable en milieu acide (Boccellato et *al*., 2018).

2.2.4. Consommation d'alcool

La consommation excessive d'alcool peut conduire à la formation de l'ulcère gastrique chez un individu sain et augmente le risque d'hémorragies chez les patients présentant déjà un ulcère

gastroduodénal (Kuipers et Blaser, 2013). Les effets de l'alcool sur la muqueuse gastrique sont complexes et multiples. Ils peuvent être associés à une perturbation de l'équilibre entre les facteurs protecteurs et les facteurs agressifs (Mezdour et *al*., 2017). La muqueuse gastrique est exposée à l'acide gastrique, à la pepsine et aux stimulants entre autres, tandis que les facteurs gastroprotecteurs maintiennent l'intégrité de la muqueuse gastrique (le système microcirculatoire, les HCO_3^-, les prostaglandines) (Bienia et *al*., 2002).

D'autres facteurs clé dans la pathogenèse des ulcères gastriques sont les mauvaises habitudes alimentaires et le tabac par l'augmentation de la sécrétion gastrique ce qui peut aggraver les dommages ou potentialiser l'action des agents agressifs sur la muqueuse gastrique (Savegnago et *al*., 2006).

3. Symptômes et complications

Les ulcères gastriques peuvent causer une douleur rongeant ou semblable à une brûlure dans la région épigastrique. La douleur se manifeste souvent une à trois heures après les repas et disparait après l'ingestion de nourriture. Elle est associée à un manque d'appétit, des éructations, des nausées, et des vomissements (Elaine et Marieb, 2008). Les complications d'un ulcère de l'estomac sont l'hémorragie, la perforation, la sténose et la transformation cancéreuse. Pour cette dernière complication seule l'ulcère gastrique peut devenir cancéreux (Lesur et *al*., 2000).

4. Diagnostic

On ne peut pas poser un diagnostic d'ulcère d'estomac simplement sur la base de l'évaluation des symptômes présents. Certains tests doivent être entrepris à la demande du médecin traitant pour confirmer le diagnostic. Le médecin peut faire passer des rayons X pour examiner l'intérieur de l'estomac. Il peut aussi prescrire la gastroscopie (Loygue et *al*., 1982). De plus, une biopsie peut être requise, c'est-à-dire un prélèvement de petites portions de la paroi de l'estomac, dont l'examen permet éventuellement de détecter des cellules anormales, cancéreuses ou la bactérie *Helicobacter pylori* (Pailler et *al*., 1990). Le médecin peut aussi faire passer un simple test respiratoire ou une analyse de sang ou des selles pour déterminer la présence de cette bactérie (Grahama et Miftahussurur, 2018).

5. Traitements

Le traitement de l'ulcère gastrique peut être médical ou chirurgical :

5.1. Traitement médical

Le traitement médical peut être curatif lorsque l'affection est déjà confirmée ou préventif dans le cas contraire. Plusieurs traitements sont utilisés dans la thérapeutique de l'ulcère gastrique dont les

anti-sécrétoires et les protecteurs de la muqueuse, une antibiothérapie est aussi utilisée lorsqu'il y a une infection à l'*H. pylori* (Neal, 2013).Les traitements antiulcéreux peuvent être classés en différentes catégories selon leur action au niveau de l'estomac ou la muqueuse gastrique. Les principaux médicaments utilisés dans le traitement antiulcéreux sont représentés dans **le tableau 2**.

Tableau 2. *Classification des principaux médicaments antiulcéreux (Bourin et al., 1993; Francoeur et al., 2010; Sogni, 2010).*

Catégorie		Mécanisme d'action	Exemple
Anti-sécrétoires	Les inhibiteurs de la pompe à proton (IPP)	Les IPP bloquent l'action de la pompe H^+/K^+ ATPase (élément principal de la sécrétion des ions H^+) qui se trouve au niveau des cellules pariétale.	Oméprazol [Mopral®]
	Les antihistaminiques H2	Occupent les récepteurs H2, bloquant l'action de la molécule régulatrice (histamine) diminuant ainsi la sécrétion acide.	Cimetidine [Tagamet®]
	Les analogues de la prostaglandine	Se fixent aux récepteurs membranaires et bloquent les canaux calciques ce qui diminue la sécrétion acide et augmente celle du mucus, ils peuvent également agir comme cytoprotecteur.	Misoprostol [Cytotec® 200µg]
Les protecteurs de la muqueuse	Les antiulcéreux Topiques (polymères)	Une foi polymérisés, ils se fixent sur la muqueuse ulcérée formant un bouclier de protection contre l'acidité gastrique et autres agression empêchant la diffusion de l'acide dans la muqueuse.	Sucralfate [Sulcrate®, Ulcar®, Kéal®]
	Les antiacides et pansements (neutralisants)	Utilisés pour la prévention ou le traitement de la douleur, ils neutralisent l'ion H^+ par la réaction inverse de sa production. $HCO_3^- + H^+ \longrightarrow H_2O + CO_2$	Hydroxyde d'aluminium [Phosphalugel®] et de magnesium [Maalox®]

- **Les inhibiteurs de la pompe à proton (IPP) : Oméprazole**

L'oméprazole, un benzimidazole substitué, est le principal inhibiteur de la pompe à protons. Il fait partie de la nouvelle génération de molécules anti-sécrétoires (Brooks et Watson, 1997).

L'oméprazole est un puissant antagoniste de la pompe à protons $H^{+/}K^{+}$ ATPase, C'est un puissant inhibiteur de la sécrétion d'acide gastrique. Il a une longue durée d'action, et l'effet thérapeutique est obtenu avec une seule dose quotidienne (Doubek et *al*., 1996).

Après une dose orale unique, l'oméprazole est rapidement absorbé avec des concentrations plasmatiques maximales dans les 0,5 heures. Contrairement à la longue durée d'action antisécrétoire, l'oméprazole est rapidement éliminé du plasma. La demi-vie est inférieure à 1 heure La biodisponibilité après une dose unique est de 35% et augmente lors de l'administration répétée une fois par jour à 60%. L'oméprazole est complètement métabolisé dans le foie. Les deux principaux métabolites plasmatiques sont le sulfone et l'hydroxyomeprazole, qui ne contribuent pas à l'activité antisécrétoire (Doubek et *al*., 1996). **Le tableau 3** résume les principaux paramètres pharmacocinétiques de l'oméprazole.

Tableau 3. *Paramètres pharmacocinétiques d'oméprazole 20mg (Doubek et al., 1996).*

Dose (mg)	C max (mg/l)	T max (h)	Biodisponibilité (%)	Liaison aux protéines (%)	Volume de distribution (l/kg)	Temps de demi-vie (h)
20	0.75-1.15	0.5	35-60	96	0.34	0.7-0.87

Lorsqu'il y a une infection à l'*H. pylori*, l'éradication du germe se fait par une triple thérapie qui est l'association de deux antibiotiques à un inhibiteur de la pompe à protons (IPP) (Clarithromycine + Amoxicilline + Omeprazol) (Francoeur et *al*., 2010).

5.2.Traitement chirurgical

Les échecs du traitement médical sont rares, il arrive cependant qu'un pourcentage minime d'ulcères résiste à un traitement bien conduit, dans ce cas on fait recours à la chirurgie (Rambaud, 2000). Les objectifs de la chirurgie sont d'enlever l'ulcère en cas d'ulcère gastrique et de supprimer les mécanismes de la maladie ulcéreuse.

5.3. Phytothérapie

Puisque la plupart des traitements médicamenteux présentent des effets secondaires, l'utilisation de phytoconstituants pour traiter les affections majeures s'est révélée cliniquement efficace et moins toxique (Jainu et Devi, 2006). En médecine traditionnelle, plusieurs plantes sont utilisées dans le traitement des ulcères. Parmi ces plantes, le grenadier (*Punica granatum*), le plus utilisé dans notre région et en Algérie en générale.

Chapitre III : *Punica granatum,* Acide gallique

1. Le grenadier : *Punica granatum*

1.1. Description botanique

Le grenadier (*Punica granatum*), appartenant à la famille des Punicaceae, est un petit arbre, souvent juste un arbuste, originaire du bassin méditerranéen ou du Moyen-Orient, mais actuellement cultivé dans la plupart des régions chaudes ou à hiver doux. Le grenadier peut atteindre 6 m de haut, possède des fleurs rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un court pédoncule, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupes de deux ou de trois au sommet des branches. Le fruit, dénommé la grenade, est une grosse baie ronde, de la taille d'une pomme ou d'un pamplemousse, à écorce dure et coriace également appelée malicorium, de couleur rouge ou jaune-beige. Ce fruit renferme de nombreuses graines de couleur rose à rouge (Jurenka, 2008) **(Figure 9)**.

Figure 9. *Différentes parties de grenadier (Bidri et Choay, 2016; Calin et Carboneli, 2005).*

1.2. Systématique

La classification de *Punica granatum* décrite par Spicheger et Savolenen (2004) est représentée dans **le tableau 4**.

Tableau 4. *Systématique de la Punica granatum (Spicheger et Savolenen 2004).*

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

1.3. Composition chimique

L'étude des composants bioactifs du grenadier et de leurs bienfaits pour la santé humaine est un domaine de recherche de toute actualité et du plus grand intérêt. Il a été constaté, suite à de nombreuses études scientifiques, que le grenadier et ses produits dérivés contiennent de nombreux composants pouvant servir à prévenir certaines maladies et à conserver la santé (Larrosa et *al*., 2006; Sartippour et *al*., 2008; Koyama et *al*., 2010). Le grenadier (*Punica granatum*) est riche en phytoconstituants qui sont distribués à ses différentes parties telles que les fruits, les graines, les feuilles, les fleurs, les racines, les jus et les écorces de fruits (Jacinto, 2018). **Le tableau 5** résume les principaux constituants thérapeutiques du grenadier.

Tableau 5. *Principaux constituants des différentes parties du grenadier (Jurenka, 2008).*

Partie du grenadier	Constituants
Jus de fruit	Anthocyanines, glucose, acide ascorbique, acide ellagique, acide gallique, acide caféique, catéchines, EGCG, quercétine, rutine, nombreux minéraux, acides aminés.
Huile de graine	95% acide punique, acide helladique et autre acides gras, stérols.
Péricarpe (écorce et zeste) de fruit	Punicalagins phénoliques, acide gallique et autres acides gras, catéchine, EGCG, quercétine, rutine, et autres flavonoles, flavones, flavonones, nthocyanidines.
Feuilles	Tanins (punicalin et punicafolin) et flavones glycosides (lutéoléine et apigénine).
Fleurs	Acide gallique,acideursolique, triterpenoides.
Racines et écorce	Ellagitannins (punicalins et punicalagins), nombreux alcaloïdes.

1.4. Usages thérapeutiques et activités biologiques

Le grenadier a été utilisé depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques. En médecine Ayurvedique, le grenadier est considéré comme une pharmacie en soi. Et il a été utilisé comme agent antiparasitaire, tonique sanguin et pour traiter les aphtes, les diarrhées et les ulcères (Jurenka, 2008). Les activités biologiques et pharmacologiques des produits issus de *Punica*

*granatum*ont été décrites à travers plusieurs études scientifiques : antiathérosclérotique (Stowe, 2011), antimicrobien (Foss et *al*., 2014), antidiabétique (Salwe et *al*., 2015), anti-inflammatoire (Lee et *al*., 2010), analgésique (Bagriet *al*., 2010), antidiarrhéique (Pillai et *al*., 1992), antimutagène (Zahin et *al*., 2010), antioxydant (Rajan et *al*., 2011), antiparasitaire (El-Sherbini et *al*., 2010), antiviral (Haidari et *al*., 2009), astringent (Pacheco-Palencia et *al*., 2008), cancer-chimiopréventif (Dahlawi et *al*., 2012), fertilité (Turk et *al*., 2008), activité neuronale (Cambay et *al*., 2011), activité gastroprotectrice (Lai et *al*., 2009), hépatoprotectrice (Kaur et *al*., 2006), néphroprotectrice (Bouroshaki et *al* ., 2010) et de blanchiment de la peau (Yoshimura et *al*., 2005).

1.4.1. Activité anti-ulcéreuse

L'effet anti-ulcéreux de *Punica granatum* est lié à la sécrétion croissante de mucus de la paroi gastrique. Cela peut inhiber la génération des radicaux libres dérivés de l'oxygène, diminuer la consommation de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase, et maintenir la teneur en oxyde nitrique (NO) à un niveau normal (Lai et *al*., 2009). Des études *in vivo* ont démontré que l'extrait de l'écorce de la grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol grâce à ses propriétés anti-oxydantes. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d'extrait hydroalcoolique de grenade (70% méthanol v/v), le pourcentage d'inhibition est respectivement de 22,37% et 74,21% pour les ulcères induits par l'aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l'éthanol (Ajaikumar et *al.*, 2005). L'étude de Moghaddam et ses collaborateurs en 2013 a montré que l'extrait de l'écorce de grenade, à un potentiel curatif contre l'ulcère gastrique induit par l'indométhacine grâce à son activité anti-oxydante élevée.

1.4.2. Action cicatrisante

Comparé à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de l'écorce de grenade (44% de composés phénoliques) à 5% permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de 10 jours, les rats traités au gel à l'extrait de l'écorce de grenade sont guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins (Murphy, 2004). Les analyses par HPLC montrent que les composants majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (Murphy, 2004).

1.4.3. Activité anti-oxydante

La composition des différentes parties du grenadier a montré l'existence de plusieurs types de polyphénols ayant des propriétés anti-oxydantes très importantes à savoir les tanins que l'on trouve en concentration très élevée dans les tiges et l'écorce du grenadier (Seeram et *al*., 2006). Chez

l'animal, il a été rapporté que l'extrait de grenade neutralise les radicaux libres et diminue le stress oxydatif dans les macrophages péritonéaux de souris, et entraîne une augmentation du taux de glutathion réduit (Jurenka, 2008). Les extraits aqueux et alcooliques de l'écorce de fruit ont montré un bon effet anti-radicalaire avec IC_{50} entre 34,78 ±14,04 et 135,27± 35,5 µg/ml pour les extraits aqueux et 40,03 ± 14,72 à 105,93 ± 17,19 µg / ml pour les extraits alcooliques (Rajan et *al*., 2011). Une étude séparée chez les rats avec des dommages au foie induits par le CCl_4 a démontré que le prétraitement avec l'extrait de l'écorce de grenade (EEG) a amélioré ou maintenu l'activité de piégeage des radicaux libres des enzymes hépatiques : La catalase, le superoxyde dismutase, et la peroxydase, et abouti à 54% de réduction des valeurs de la peroxydation lipidique par rapport aux témoins (Chidambara et *al*., 2002).

1.4.4. Activité anti-inflammatoire

Il y a de nombreuses études scientifiques qui démontrent clairement les propriétés anti-inflammatoires de la grenade et de ses produits dérivés (Lansky et Newman, 2007; Shukla et *al*., 2008; Larrosa et *al*., 2010; Lee et *al*., 2010). Certains extraits de grenade, notamment les pépins pressés à froid, inhibent l'action des enzymes cyclo-oxygénases et lipo-oxygénases *in vitro*. La cyclo-oxygénase est une enzyme très importante pour la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, qui sont des médiateurs importants de l'inflammation, de sorte que cet acide se trouve fortement inhibé par la consommation d'extraits de grenade. La lipo-oxygénase conduit à la transformation de l'acide arachidonique en leucotriènes, qui sont d'autres médiateurs de l'inflammation, qui est également inhibée par les extraits de pépins de grenade (Schubert et *al*., 1999).Les extraits aqueux éthanoliques de l'écorces de fruit à 500 mg / kg par voie orale ont inhibé l'inflammation de 82,14% contre l'indométacine à 10 mg/kg (Bagri et *al*., 2010).

1.5. Toxicité

Selon l'étude de Tripathi et Singh (2000), seuls les écorces et les racines de la plante ont été signalées comme étant toxiques vue leur teneur élevée en alcaloïdes. La DL_{50} de l'extrait du fruit entier, déterminée chez des souris OF-1 des deux sexes après administration intrapéritonéale est de 731 mg / kg (Vidal et *al*., 2003). Dans une étude visant à étudier la toxicité aiguë et subaigue d'un extrait de grenade standardisé contenant 30% de punicalagines donné par voie orale, la DL_{50} chez les rats Wistar et les souris Swiss albinos était supérieure à 5000 mg/kg et la toxicité subaigue est nulle. La dose sans effet nocif observable (DSENO) ou (NOAEL : *No Observable Adverse Effect Level)* a été déterminé à 600 mg/kg/jour (Patel et *al*., 2008).Une étude récente de toxicité aiguë par voie orale réalisée chez les poulets a montré que l'extraits bruts de *Punica granatum* peut être utilisé en toute sécurité jusqu'à la dose de 2000 mg / kg de poids corporel (Ahad et *al*., 2018).

2. Acide gallique

Les polyphénols sont considérés comme des composés quasi universels des végétaux. Structurellement, ils se répartissent en plusieurs groupes allant de composés présentant un simple noyau phénolique comme l'acide gallique aux composés polymériques complexes comme les tanins (Boukhobza et Goetz, 2014). Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve d'une manière générale dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: feuilles, fleurs, racines, tiges, bois, écorces et fruit. Les polyphénols existent sous différentes classes : acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilbènes et lignanes. Mais les plus importants sont: les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins (Singh et *al*., 2011). Les acides phénoliques sont des composés universels rencontrés dans les plantes, ils sont classés on deux groupes: Les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique, et les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique (Singh et *al*., 2011). Les différentes classes des composes phénoliques sont représentées dans **la figure 10** ci-dessous.

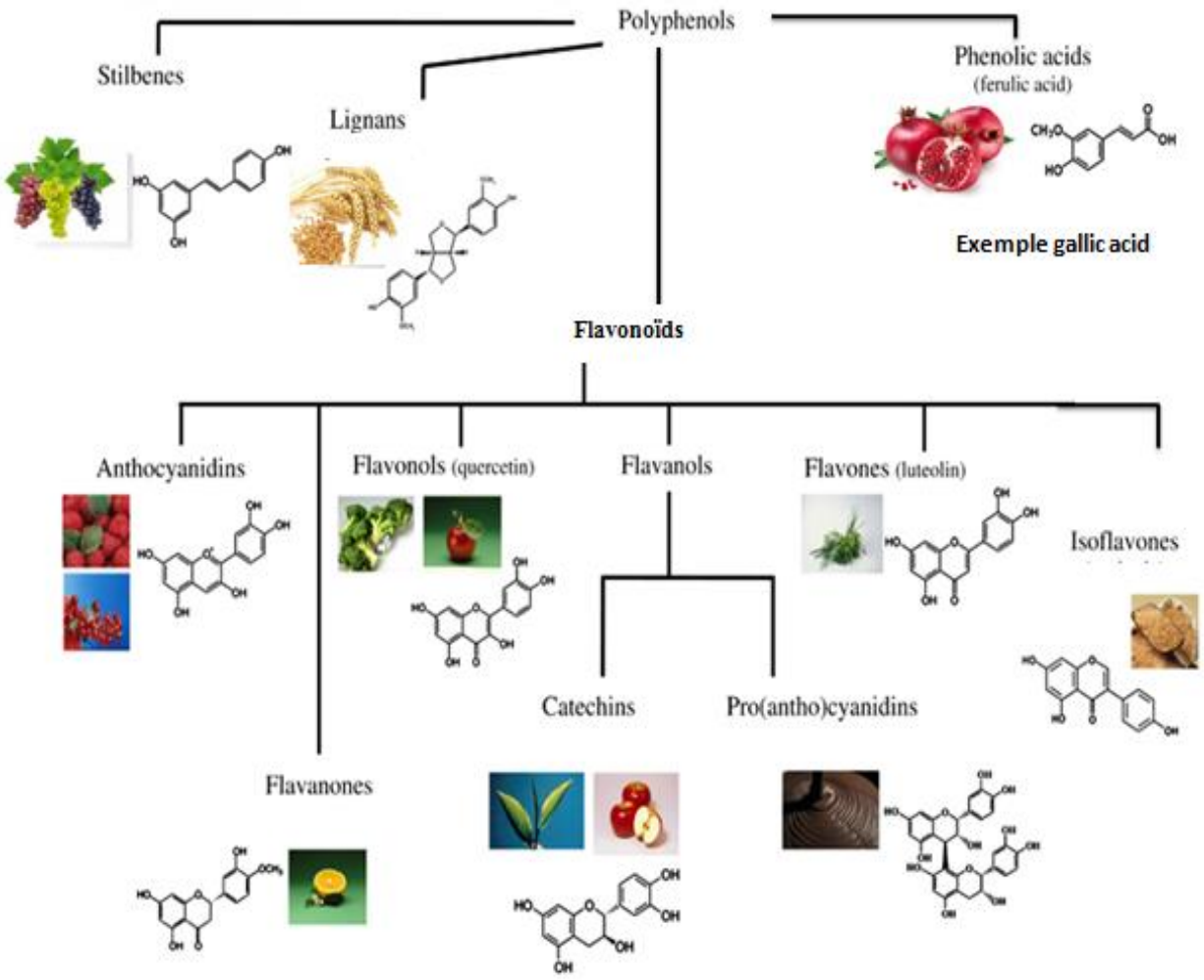


Figure 10. *Différentes classes de polyphénols et leurs sources connues de plantes et de fruits (Singh et al., 2011).*

L'acide gallique où également connu sous le nom d'acide 3, 4, 5trihydroxybenzoïque **(figure 11)**, est une substance phytochimique que se trouver dans de nombreux tissus végétaux à l'état libre ou en tant que composant du polymère tanin (Subramaniana et *al*., 2015).Ce composé est naturellement abondant dans les noix, les raisins, les grenades, le thé vert, l'ananas, les bananes, les fraises, le citron et le vin rouge (Madlener et *al*., 2007). Sa formule chimique est du cycle C_6H_2 $(OH)_3COOH$. L'acide gallique est classé parmi les acides phénoliques puisqu'il comporte à la fois une fonction carboxylique et des hydroxyles phénoliques. Et comme il est dérivé de l'acide benzoïque, on le classe aussi dans les acides hydroxybenzoïques (Prince et *al*., 2009).

Les propriétés chimiques de l'acide gallique furent étudiées par le chimiste Jules Pelouze (1836), qui a été trouvé que l'acide gallique se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche ou jaune pâle, inodore, de saveur acide. Leur solubilité dans les différents solvants est classée selon l'ordre suivant : Méthanol> éthanol > eau > acétate d'éthyle (Verma et *al*., 2013).

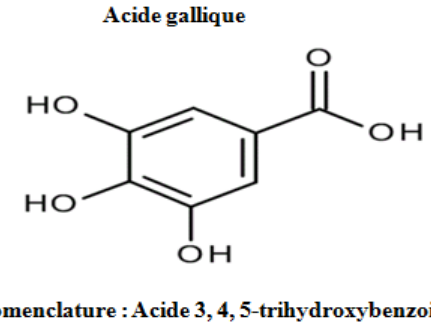


Figure 11. *Structure chimique de l'acide gallique (Verma et al., 2013).*

2.1. Pharmacocinétique

Certains composés phénoliques chez l'homme sont absorbés en peu de temps et d'autres non, avec ou sans modification de la structure. Des résultats similaires du temps d'absorption de l'acide gallique ont été obtenus avec la consommation de thé noir et de vin rouge. Dans une étude impliquant des humains en bonne santé, lorsque l'acide gallique était absorbé, quelle que soit la forme sous laquelle il était consommé (forme purifiée, vin ou thé), il était présent sous des structures méthylées et glucuronidées. Lorsque les volontaires ont consommé 200 ml de thé noir, l'acide gallique a été rapidement détecté dans le plasma à 1,4-1,5 h et sa concentration (aglycone et métabolites) était de 4,7 µM. Cartron et *al*., (2003) ont montré que l'acide gallique était retrouvé sans modification de structure dans le plasma humain avec une concentration maximale atteinte <1,5 h après la consommation de vin rouge; peut-être que la matrice alimentaire n'a peut-être pas influencé la biodisponibilité de l'acide gallique, mais des études plus spécifiques sont nécessaires

pour refléter la situation réelle au niveau cellulaire des composés phénoliques dans les aliments végétaux.

2.2. Biosynthèse

Plusieurs études ont postulé l'existence de deux voies potentielles pour la synthèse d'AG **(figure 12)**. Il pourrait être formé à partir de phénylalanine **(4)** ou à partir d'un intermédiaire de shikimate précoce, à savoir le 3-déhydroshikimate (3-DHS) **(2)** (Kato et *al*., 1968). Cependant, le groupe carboxylique de l'AG s'est avéré être biosynthétiquement équivalent au groupe carboxylique de shikimate, plutôt qu'à la chaîne latérale de phenylalanine (Werner et *al*., 2004). Cela signifie donc que l'AG est formé à partir de 3-DHS (Ossipov et *al*., 2003 ; Werner et *al*., 2004) soit par déshydrogénation directe ou via l'acide protocatéchique **(3)** en tant qu'intermédiaire (Kambourakis et *al*., 2000). Bien que Werner et *al*., (1997) en utilisant des études RMN rétro-biosynthétiques avec du glucose marqué au C_{13} et la spectrométrie de masse du rapport isotopique de l'oxygène, a montré que l'AG est principalement synthétisée par déshydrogénation directe de 3-DHS. Les résultats concordent bien avec les rapports antérieurs de Dewick et Haslam, (1969).

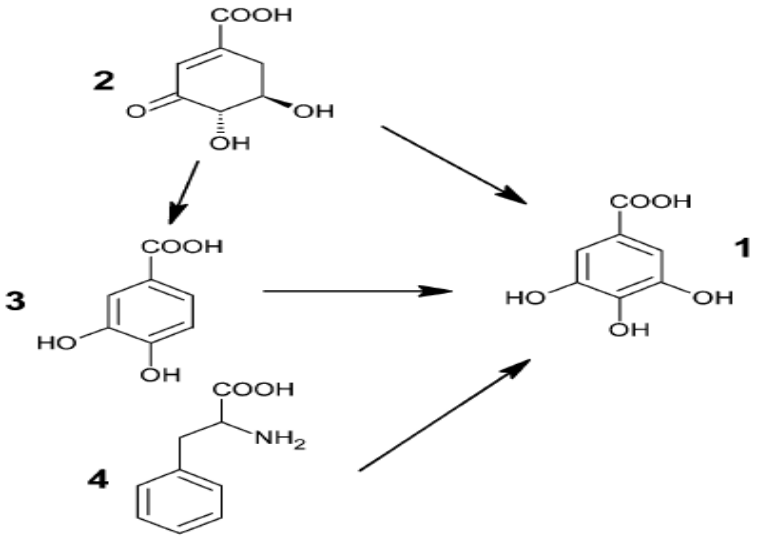


Figure 12. *Voies possibles pour la biosynthèse de l'acide gallique (**1**: l'acide gallique, **2**: 3- acide déhydroshikimique, **3**: acide protocatéchuique, **4**: phénylalanine) (Badhani et al., 2015).*

2.3. Activités pharmacologiques

L'acide gallique et ses dérivés ont un grand nombre d'applications dans divers domaines biologiques et pharmaceutiques (Madlener et *al*., 2007). Une étude récente a démontré que l'acide gallique, et ces dérivés sont largement utilisées pour le traitement de plusieurs maladies (Borde et *al*., 2011). L'acide gallique possède une excellente activité anti-ulcéreuse (sen et al., 2013), anti-oxydante

(Yen et *al*., 2002), anti-obésité (Hsu et Yen. 2007), hépatoprotectrice (Jadon et *al*., 2007), anti asthmatique (Dorsch et *al*., 1992), anti-cancéreuse (Subramaniana et *al*., 2015), neuroprotectrices (Kim et *al*., 2006), cardioprotectrices (Daglia et *al*., 2014), néphroprotectrices (Akomolafe et *al*., 2014), antimutagènes, antiangiogéniques (Kaur et *al*., 2009), anti-inflammatoires (Sowndhar Rajan et *al*., 2018), antifongique, antivirales et antimicrobiens (Faried et *al*., 2007).

2.3.1. Activité anti-ulcéreuse

Dans des expériences *in vivo* réalisées sur les rats, il a été démontré que l'acide gallique joue un rôle très important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que l'acide gallique exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus par l'augmentation des facteurs de défense gastrique en particulier le bicarbonate et la prostaglandine. Et d'autre partie par le piégeage des radicaux libres (Yen et *al*., 2002). D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de l'acide gallique et l'effet antioxydant (Hsu et *al*., 2007). D'autres recherches ont démontré que les acides phénoliques présentent un certain nombre de propriétés pharmacologiques dans le tractus gastro-intestinal, agissant comme agents anti-sécrétoires et cyto-protecteurs qui se produisent par un mécanisme impliquant l'atténuation des facteurs offensifs et l'amélioration de la défense de la muqueuse gastrique (Sumbul et *al*., 2011). En effet, une autre étude récente a démontré que l'acide gallique à la dose de 100 et 200 mg / kg a exercé une inhibition de 69,7 % de l'ulcère gastrique induit par l'aspirine (sen et *al*., 2013).

2.3.2. Activité cicatrisante

Selon l'étude réalisée par Chatterjee ses collaborateurs (2012), l'extrait éthanolique de Phyllanthus emblica fruits (amla) enrichi en acide gallique (AG) à une activité cicatrisante contre l'ulcération gastrique induite par l'indométhacine chez les souris. L'activité était corrélée avec la capacité de l'AG à modifier les voies de cicatrisation dépendantes de la cyclooxygénase (COX). Les études histologiques des tissus stomacaux ont révélé une ulcération maximale le troisième jour après l'administration d'indométhacine (18 mg / kg dose unique) associée à une augmentation significative des facteurs inflammatoires à savoir l'activité de la myéloperoxydase muqueuse (MPO) et l'oxyde nitrique synthase inductible (NOS-i). Le traitement avec l'AG à la dose 5 mg / kg / jour et oméprazole 3 mg / kg / jour pendant 3 jours a conduit à une cicatrisation efficace de l'ulcération aiguë par l'induction de la synthèse de PGE2 et en augmentant le rapport (NOS-e / NOS-i) (chatterjee et *al*., 2012).

2.3.3. Activité anti-inflammatoire

L'acide gallique et ses dérivés sont des produits polyphénoliques ayant un large intérêt pharmacologique y compris l'activité antioxydant et anti-inflammatoire. Une étude expérimentale réalisée sur des rats a démontré que l'acide gallique exerce un effet anti-inflammatoire en bloquant la libération d'histamine et l'expression des cytokines pro-inflammatoires. La même étude suggère que l'acide gallique a également une activité antiallergique (kim et *al*., 2006).

En effet, une autre étude réalisée sur la lignée cellulaire RAW264.7 a démontré que l'utilisation de l'acide gallique influencé sur le niveau des médiateurs pro-inflammatoires en réduit les taux des cytokines pro-inflammatoire comme : IL-1B, IL6, NO, NOS, COX-2 et TNF-alpha dans les cellules (Bensaad et *al*., 2017). Une nouvelle expérience réalisée chez les souris de la souche Swiss albinos, suggère que l'acide gallique possède un pouvoir anti-inflammatoire par la diminution du taux des cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Sowndhar Rajan et *al*., 2018).

2.3.4. Activité anti-oxydantes et pro-oxydantes

L'acide gallique est un bon piégeur des radicaux libres, une étude expérimentale a démontré que l'AG à la concentration de 4,17 mM est capable de piéger 44 % des radicaux $DPPH^{\bullet}$ et 60 % du peroxyde d'hydrogène. Et à une concentration de 1,65 mM il peut accélère l'oxydation du désoxyribose induite par des radicaux hydroxyles $^{\bullet}OH$. Au-delà de cette concentration, l'acide gallique est considéré comme un antioxydant capable de réduire les dommages du désoxyribose occasionnés par Fe^{3+} et H_2O_2 (Yen et *al*., 2002). En 2013 Sen et ses collaborateurs a démontré que l'effet anti-oxydants de l'AG est due à l'augmentation de la glucose-6-phosphate déshydrogénas et la réduction de la myéloperoxydase et la peroxydation lipidique (sen et *al*., 2013). Une autre expérience réalisée *in vitro* suggère que l'acide gallique exercer un effet anti-radicalaire et anti peroxyde (Asnaashari et *al*., 2014). En effet, dans une étude visant à étudier l'activité antioxydant d'AG sur l'hépatotoxicité induit par la doxorubicine (Dox) chez des rats Wister a montré que l'AG améliorant l'hépatotoxicité et le stress oxydatif par la diminution de la production de peroxyde d'hydrogène, l'augmentation de la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et l'activité glutathion-S-transférase (Omobowale et *al*., 2017). Une étude actuelle réalisée *in vitro* a démontré que l'AG peut être considérée comme un puissant antioxydant par la diminution de la peroxydation lipidique et la formation des composés polaires (Farhoosha et Nyströmb, 2018).

Malgré que les propriétés anti-oxydantes des polyphénols corroborent l'hypothèse d'un rôle positif dans la nutrition humaine et la prévention de maladies, certains auteurs invoquent l'activité pro-oxydante de ces composés *in vitro* (Fukumoto et Mazza, 2000). Seuls les polyphénols les plus

réducteurs peuvent manifester cet effet en entrant dans des cycles redox qui génèrent des ERO. L'acide gallique est capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+}ou Cu^{2+} en Cu^{+}, et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle **(Figure 13)**. Le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la réaction est produit par autoxydation des ions de basse valence. Par leurs effets pro-oxydants, certains polyphénols peuvent endommager l'ADN, les lipides et d'autres biomolécules. La signification biologique de ces effets pro-oxydants est dépendante de la présence d'ions du fer libres (Aruoma et *al*., 1993; Yen et *al*., 2002).

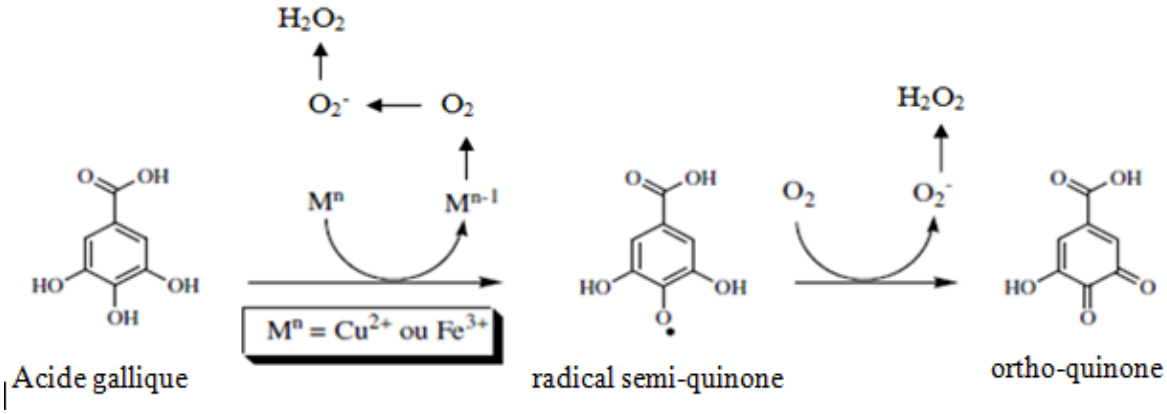


Figure 13. *Mécanisme de formation d'ERO par l'acide gallique (Kobayashi et al., 2004).*

2.4. Toxicité

L'acide gallique est bien connu pour ces activités pharmacologiques, mais tout d'abord il faut établir leur sécurité dans le corps humains. Selon Rajalakshmi (2001), l'administration d'une dose unique de 5 g/kg de poids corporel n'a produit aucun signe de toxicité ou de mortalité. Dans l'étude subaiguë, l'acide gallique à la dose de 1000 mg / kg de poids corporel n'altére pas les paramètres hématologiques, les paramètres biochimiques tels que l'ASAT et l'ALAT, ainsi que de nombreux constituants sériques tels que les protéines, le cholestérol, l'urée et la bilirubine. Par conséquent, l'acide gallique est non toxique jusqu'à un niveau de 5000 mg /kg de poids corporel lorsqu'il est administré par voie orale (Rajalakshmi et *al*., 2001). Dans une étude de toxicité sub-chronique de l'acide gallique (AG) chez les deux sexes des rats F344 par un régime alimentaire contenant 0, 0.2, 0.6, 1.7 et 5% d'AG. L'administration orale d'AG pendant 13 semaines a provoqué une anémie, probablement d'origine hémolytique et une hypertrophie des cellules hépatiques. D'après les changements hématologiques observés chez les mâles ayant reçu la dose de 0,6%, le NOAEL de l'AG a été estimée à 0,2% dans le régime alimentaire. Cette dose a été traduit en 119 et 128 mg/kg/ jour respectivement (Niho et *al*., 2001).

Matériel
&
Méthodes

L'étude expérimentale a été réalisée au niveau de laboratoire de Biochimie, département de BMC université de Jijel. Elle est consacrée pour l'évaluation de l'effet gastro-protecteur et anti-inflammatoire de l'écorce de grenade (*Punica granatum*) et de l'acide gallique.

1. Etude phyto-chimique de l'écorce de *Punica granatum*

1.1. Matériel

Notre étude a été réalisée sur les écorces de grenade qui ont été achetées chez l'herboriste sous la forme sèche (Figure 14A). Après broyage, la poudre végétale obtenue (Figure 14B) est conservée à l'abri de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermées.

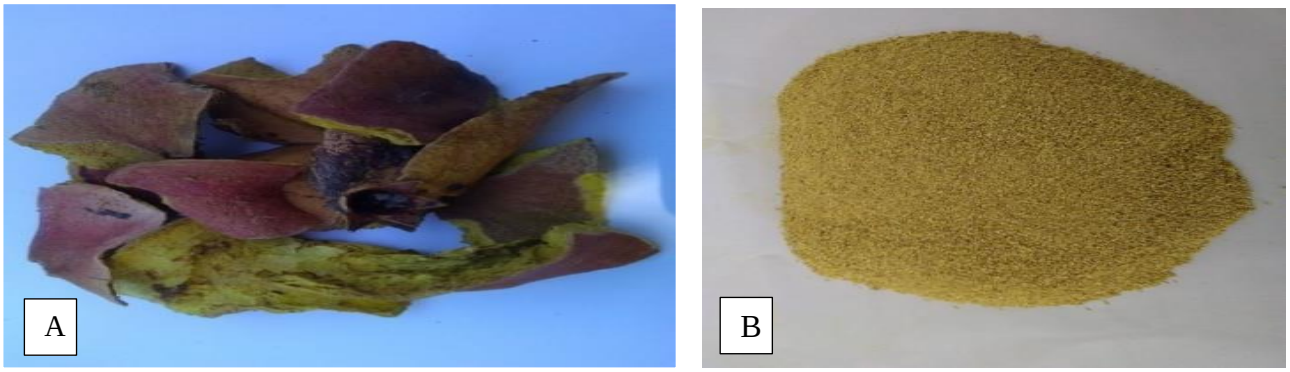


Figure 14 . *Ecorces (A) et poudre (B) de grenade (Punica grantum) utilisé.*

1.2. Préparation de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum*

L'extraction des polyphénols de l'écorce de *Punica granatum* a été réalisée selon le protocole décrit par Kanoun et *al.* (2014). La poudre obtenu de l'écorces de grenade est soumise à une extraction par macération dans le méthanol 99% (50g de la poudre de l'écorce de grenade pour 250 ml du solvant) sous agitation continue et à l'abri de la lumière pendant 48h. Après filtration sous papier Wattman N°3, le filtrat est évaporé à sec en utilisant un évaporateur rotatif (BUCHI R-300) à 45°C avec une rotation de 95 à 100 rpm (Figure 15). Après évaporation, le résidu obtenu appelé extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* (EMEP) est pesé pour calculer le rendement d'extraction selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction en (\%)} = (E_1 / E_0) \times 100.$$

Avec : $\mathbf{E_1}$ **:** masse de l'extrait sec obtenu (g), $\mathbf{E_0}$ **:** masse de la prise d'essai de départ (g).

Le même protocole a été utilisé pour la préparation de l'extrait éthanolique, qui est utilisé seulement pour l'analyse chimique de ses constituants par CG-MS.

A : Macération B : Filtration C : Evaporation à l'aide d'un rotavapor

Figure 15. *Etapes de préparation de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade (Punica granatum).*

1.3. Dosage des composés phénoliques

1.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en polyphénols a été dosée par la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965) en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. Ce dernier est un acide de couleur jaune réagit avec les résidus phénoliques et conduit à la formation d'un complexe coloré en bleu dont l'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des polyphénols dans l'extrait. Pour cela, 0,125ml de l'extrait métanolique est mélangé avec 0,5ml d'eau distillée et 0,125 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 50%. Après 6 min d'incubation, 1,25 ml de Na_2CO_3 (7%) ont été ajouté et le volume final est ensuite ajusté avec de l'eau distillée à 3ml. Après 90min d'incubation à 25°C, l'absorbance a été lue à 760 nm. La teneur en composés phénoliques dans l'extrait a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage préparée avec l'acide gallique (400µg /ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50µg/ml, et 25µg/ml) (Annexe 1). Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de poudre de l'écorce de grenade.

1.3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été mesurée selon la méthode décrite par Dewanto et *al.,* (2002). La technique est basée sur la formation d'un complexe jaune entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium $AlCl_3$. Pour cela, 250 µl de l'extrait méthanolique dilué de manière appropriée est mélangé avec 75µl de $NaNO_2$ (5%). Après 5min d'incubation à température ambiante, 150µl de $AlCl_3$ à 10% et 500µl de NaOH (1M) ont été ajoutés. En utilisant l'eau distillée, le mélange a été ajusté à 2,5ml et l'absorbance a été lu à 510 nm. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme de l'extrait, en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine (25µg/ml, 50µg/ml, 100µl/ml, 200µl/ml) (Annexe 2).

1.3.3. Dosage des tanins hydrolysables

Le dosage des tanins hydrolysables a été réalisé en suivant la méthode de Mole et Waterman, (1987). Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique et donnent un complexe de coloration bleu mesurée par spectrophotométrie. Pour cela, 1ml d'extrait est mélangé avec 3.5 ml (FeCl3 0.01% dans HCl 0.001M), après Homogénéisation et incubation pendant 10 mn, les absorbances ont été mesurées à 660 nm. La teneur en tanins hydrolysables est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide tannique. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par g de matière sèche (mg EAT/g Ms) (Annexe 3).

1.4. Analyse GC-MS

L'analyse chimique des extraits méthanolique et éthanolique a été réalisée en utilisant la chromatographie gazeuse Shimadzu GC-2010 couplée au spectromètre de masse QP2010. 1 µl de l'échantillon a été injecté dans l'injecteur sur une colonne capillaire en verre OV1701 de 25 m. Du gaz vecteur (He) a été utilisé à un débit de 1ml/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenues à 250 °C. Le programme de température était de 80°C/120°C/250°C. La durée totale de fonctionnement a été achevée en 45 minutes. Le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse a ensuite été analysé en spectrométrie de masse pour obtenir la masse de toutes les fractions séparées. L'identification des composants a été réalisée par le temps de rétention et la comparaison des spectres de masse de pics inconnus avec ceux stockés dans Wiley 8 et la bibliothèque GC-MS de l'Institut National des Standards et de la Technologie (Nist 05).

2. Etude *in vitro* de l'activité anti-oxydante de l'extrait de grenade et de l'acide gallique

2.1. Activité anti-radicalaire ou test de DPPH

La capacité de piégeage des radicaux libres a été mesurée par la méthode 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) comme décrit par Hanato et *al*, (1988). Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits à réduire le radical DPPH°. Quand il réagit avec un composé antioxydant qui peut donner les protons hydrogènes. Le DPPH° est réduit en DPPH-H et change de couleur de violet vert le jaune, ceci se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 515 nm. 1ml de différentes concentrations d'EMEP, de l'acide gallique ou l'acide ascorbique comme control positif (400 µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml et 25µg/ml) préparé dans l'éthanol a été ajoutée à 0,5 ml d'une solution éthanolique de DPPH° à 0,2 mmol/l. Le mélange a été agité et laissé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min. L'absorbance a été ensuite mesurée

à 517 nm. Le pourcentage de réduction a été déterminé en prenant le 100% du control (DPPH° seul) selon la relation suivante :

$$\% \text{ de réduction} = [A_C - A_E/A_C] \times 100$$

A_C : absorbance du contrôle après 30mn. A_E : absorbance de l'essai après 30mn.

L'activité anti-radicalaire a été exprimée également sous forme d'IC_{50} (µg/ml), la concentration nécessaire pour provoquer une réduction de 50% du radical DPPH°.

2.2. Détermination du pouvoir réducteur du fer (FRAP)

La méthode décrite par Chew et *al*., (2009) a été adoptée pour déterminer le pouvoir réducteur du fer de l'extrait méthanolique de *Punica granatum*. Ce test est utilisé pour tester la capacité des antioxydants à réduire les ions Fe^{3+} en Fe^{2+} impliquant le mécanisme de transfert des électrons.
A 1ml de l'EMEP, d'acide gallique ou d'acide ascorbique comme control positif à différentes concentrations (400 µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml et 25µg/ml), sont ajoutés 2,5ml du tampon phosphate (0,1M ; pH = 6,6), 2,5ml d'une solution de potassium ferricyanide à 1%. Le mélange est agité puis incubé à 50°C pendant 20 min. Après l'incubation, 2.5ml de TCA (acide trichloracétique) à 10% sont ajoutés suivie d'une centrifugation à 3352xg pendant 10 minutes. 2,5ml de surnageant sont prélevés, la dilution se fait avec 2,5ml d'eau distillée puis 0,5ml de $FeCl_3$ à 0,1% sont ajoutés. Le tout est incubé à 28°C pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 700nm. L'augmentation de l'absorbance indique l'augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

3. Evaluation de l'effet gastro-protecteur de *Punica granatum* et de l'acide gallique *in vivo*

3.1. Entretien et traitement des animaux

L'étude a été menée sur 15 Rats Wistar albinos Femelles de poids moyen de 150 g, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, (Algérie). Les rats sont maintenus dans l'animalerie de l'Université de Jijel dans des conditions standards, une température ambiante de 22°C, une humidité relative de 60 % et à un cycle de lumière/obscurité de 12 /12 h. Les rats sont placés dans des cages en plastique. Ils ont accès libre à la nourriture et à l'eau.

L'activité gastro-protectrice de *Punica granatum* et de l'acide gallique a été testée sur l'ulcère expérimentalement induit par le diclofénac, selon le protocole décrit par Saiah et *al*., (2017). Les animaux sont répartis en 5 lots de 3 rats chacun.

- **Lot 1 (Témoin)** : Les rats reçoivent quotidiennement (Matin et soir) 1ml de l'eau distillée par voie orale pendant 3 j.
- **Lot 2 (Diclofénac)** : Les rats reçoivent quotidiennement 1ml de l'eau distillée par voie orale pendant 3 j, et 1 ml de diclofénac (150mg /kg) par voie orale dans le quatrième jour.
- **Lot 3 (EMEP + Diclofénac)** : Les rats reçoivent quotidiennement (Matin et soir) 1ml d'EMEP par voie orale à la dose de (100 mg/kg/j) pendant 3 j et 1 ml de diclofénac (150mg /kg) par voie orale dans le quatrième jour.
- **Lot 4 (AG + Diclofénac)** : Les rats reçoivent quotidiennement (Matin et soir) 1ml de l'acide gallique par voie orale à la dose de (100 mg/kg/j) pendant 3 j et 1 ml de diclofénac (150mg /kg) par voie orale dans le quatrième jour.
- **Lot 5 (Oméprazole+Diclofénac)** : Les rats reçoivent quotidiennement 1ml de l'oméprazole par voie orale à la dose de (20 mg/kg/j) pendant 3 j et 1ml de diclofénac (150mg /kg) par voie orale dans le quatrième jour.

3.2. Le sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques

Le sacrifice des rats a été réalisé 4h après l'administration du diclofénac (Saiah et *al*., (2017), le sang est récupéré sur des tubes héparinés pour le dosage de la CRP, et les estomacs de chaque rat sont prélevés pour l'évaluation des paramètres de stress oxydant et l'étude histologique macro-et microscopique. Les jus gastriques ont été récupérés immédiatement afin de déterminer l'acidité gastrique, le volume du jus gastrique a été mesurer immédiatement.

3.3. Mesure des paramètres gastriques

3.3.1. Etude Macroscopique et détermination de l'indice d'ulcère

Les estomacs ont été ouverts le long de la plus grande courbure puis rincés avec de l'eau physiologie pour éliminer le contenu gastrique et étalés pour faciliter le comptage des lésions. L'indice d'ulcère (IU) a été déterminé selon (Main et Whittle, 1975) et (Ajaikumar et *al*., 2005).

IU= [1× (Nombre de lésions de garde 1) +2× (Nombre de lésions de garde 2) + 3× (Nombre de lésions de garde 3)] $\times 10^{-1}$.

% d'inhibition d'ulcère = [(IU du témoin – IU du traité) / (IU du témoin)] × 100.

Les niveaux d'ulcères : 0 = pas d'ulcère, 1= ulcère superficiel, 2= ulcère profond, 3= perforation.

3.3.2. Mesure de l'acidité gastrique

Après le sacrifice, nous avons prélevé et centrifugé le jus gastrique pendant 10 min à 3000 tr/min. Le surnageant a été récupéré et l'acidité gastrique a été déterminer selon la méthode de Lakshmi et *al*., (2013), en faisant une titration par le NaOH 0.01N et quelques gouttes de phénolphtaléine comme indicateur coloré.

$$\text{Acidité} = (V_{NaOH} * N * 100\mu Eq/ml) / 0.1.$$

Avec : V : volume du jus gastrique utilisé; N : normalité de NaOH.

3.3.3. Mesure de la production de mucus gastrique

Nous avons délicatement gratté la muqueuse gastrique de chaque estomac à l'aide d'une lame en verre pour récupérer le mucus. Le poids a été pris en utilisant une balance électronique de précision (Ngenge et *al*., 2016).

3.4. Préparation de la fraction cytosolique

La préparation de la fraction cytosolique a été effectuée selon la méthode de (Sanmugapriya et Venkataraman, 2006). Nous avons coupé les estomacs en petit morceaux, ensuite nous avons homogénéisé avec 3 volumes de tampons phosphate (0.15M, PH 7.4) contenant de KCl (1.17%) et 30 µl du Triton pour faciliter le broyage. Le mélange a été broyé à l'aide d'un Potter manuel et centrifugé à 9600 tours/min pendant 30 min à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé pour réaliser les mesures des paramètres du stress oxydant cytosolique.

3.5. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du Bleu de Coomassie à 590 nm, après complexation avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans l'échantillon. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié donc à la concentration en protéines dans l'échantillon. Pour cela, 1ml de Bleu de Coomassie a été ajouté à 50 µl de l'échantillon dilués au $1/10^{ème}$. Ensuit le mélange a été incubé à température ambiante pendant 20 min et la DO a été lue à 590 nm. La concentration des protéines a été déterminée en à l'aide d'une courbe d'étalonnage préparée avec de l'albumine sérique bovin (BSA) aux concentrations (0-1mg/ml) dans les mêmes conditions (annexe 4).

3.6. Dosages tissulaires

3.6.1. Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode d'Ellman (1959). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoique (réatif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour ce dosage, 20 µl de la fraction cytosolique a été prélevé et dilué dans 3 ml du tampon phosphate (0.01 M, pH8). Ensuite 20 µl de DTNB à 0.01 M a été ajouté. Le mélange a été incubé pendant 5 minutes à 25° C et les densités ont été ensuite mesurées à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions que le dosage par le glutathion, et les concentrations sont exprimés en millimoles de glutathion par mg de protéine (Annexe 5).

3.6.2. Dosage du Malone-dialdéhyde (MDA)

Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène. Dans notre étude, les taux du MDA tissulaire sont évalués selon la méthode d'Okhawa et *al*., (1979). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C) entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un complexe coloré qui absorbe à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

Pour cela, 0.5 ml de la fraction cytosolique a été ajouté à 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1ml d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.67%. Après incubation au bain marie à 100°C durant 15 minutes puis refroidissement, 4 ml de n-butanol ont été additionnés, le mélange est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 3000 tours /min. L'absorbance du surnageant est mesurée à 530 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. La concentration du MDA dans l'échantillon est exprimée en mmole/mg de protéines. Elle est obtenue grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec du 1,1',3,3'- tetraethoxypropane faite dans les mêmes conditions (Annexe 6).

3.6.3. Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme antioxydant très importante dans le maintien d'une basse concentration de l'anion superoxyde. Elle catalyse la dismutation de l'$O^{2-\circ}$ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante :

$$2O_2^{-\circ} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique a été déterminée selon la méthode décrit par Marklund et Marklund, (1974). La mesure de l'activité de cet enzyme est basée sur la capacité de la SOD à inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol.

Pour la mesure de l'activité de la SOD, dans la cuve de mesure on met : 850µL du tampon tris HCL (50mM, PH=8.2), 16 µL de la fraction cytosolique, 100µL de l'EDTA (10mM) et ensuite 50µL de pyrogallol (2.5 mM dans HCL 10mM). La lecture de la DO est effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes.

L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase est exprimée en UI/mg de protéines selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition total (\%)} = (\text{DO Blanc} - \text{DO Echantillon} / \text{DO Blanc}) \times 100$$

$$\text{SOD (UI /mg)} = (\text{Inhibition total (\%)} / n) \times 50$$

Avec : n : la quantité de protéines (en mg) présente dans le volume de l'échantillon utilisé.

3.6.4. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

La méthode utilisée est celle de Clairborne (1985). L'activité enzymatique de la catalase a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, par la mesure de la variation de la densité optique consécutive à la consommation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 25°C en présence de la catalase de la fraction cytosolique. Pour cela, 50 µl de la fraction cytosolique a été prélevée puis 1 ml de tampon phosphate (0.1M, pH 7.2) et 950 µl du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (0.019M) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 240 nm chaque minute pendant 2mn. L'activité de la catalase est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT (UI/mg de protéine)} = (2.30333/T^* \log A_1/A_2)/ [\text{protéines}].$$

Avec : T : intervalle du temps en mn. A_1 : densité optique au temps 0 mn et A_2 : densité optique au temps 1 mn.

3.6.5. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathione peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode Flohé et Gűnzler (1984). Cette méthode est basé sur la rédaction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de GSH -Px. Pour cela, 0.4 ml de GSH (0.1mM) est ajouté à 0.2 ml de l'homogénat, puis nous avons additionné 0.2 ml de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH7.4), après 5 mn

d'incubation 0.2 ml de H_2O_2 (1.3 mM) sont ajoutés pour initier la réaction. Après 120 mn, 1 ml de TCA (1%) est additionné pour l'arrêter. Le mélange est mis dans un bain de glace pendant 30 mn, puis centrifuger durant 10 minutes à 3000 rpm. 2.2 ml de solution tampon TBS sont additionnés à 0.48 ml de surnageant et 0.32 ml de DTNB (1 mM). Après agitation, la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm. La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px a été calculée à l'aide de la formule suivante :

GSH-Px (µmol GSH/mg protéine) = X/ [protéine]

X= [(DO Echantillon – DO Blanc)* 0.04] / DO Blanc

X = Quantité de GSH disparue (oxydée).

3.6.6. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathione-S-transférase (GST)

La mesure de l'activité da la GST a été réalisée par la méthode de Habig et *al*., (1974), celle-ci consiste à fournir à l'enzyme le substrat 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraine la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340 nm, la variation de la densité optique est mesurée chaque minute pendant 5 minutes. Après incubation du mélange réactionnel contenant 1700 µl du tampon phosphate (0.1 M, pH = 6.5) et 100µl du CDBN (20 mM), à 37°C pendant 10 mn, la réaction est démarrée par l'addition de 100µl de l'homogénat dilué à 1/100 et de 100 µl de glutathion (20mM). La densité optique est lue chaque minute pendant 5 minutes à 340 nm. Le calcul de l'activité de la GSH se fait selon la réaction suivante :

Enzyme (UI/ml) = [(ΔA_{340} / min test – ΔA_{340} / min blanc) / (Vt) (fd)] / [(9, 6) (ve)].

Vt: Volume total (en millilitre) de l'essai. Fd : Facteur de dilution. Ve : (volume en millilitre)

de l'enzyme utilisée et 9,6 : coefficient d'extinction millimolaire du glutathion-1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué à 340nm.

UI/ mg de protéine = Enzyme (UI/ml) / [protéine] (mg/ml).

3.7. Etude histologique microscopique

Les fragments d'estomacs sont coupés en tranches fines et fixées dans le formol 10%. Un processus de déshydratation est réalisé par trempage dans des bains successivement plus concentré d'éthanol puis dans l'éthanol absolu, puis dans du xylène pour éliminer l'alcool. Ensuite dans des bains de paraffine et laissés se solidifier à froid. Après la réalisation des blocs, des coupes de 5µm

d'épaisseur ont été préparé à l'aide du microtome. Les coupes obtenues sont ensuite déparaffinées par le xylène puis réhydratées dans des bains d'éthanol successivement moins concentrés, puis dans l'eau, ensuite colorées avec l'hématoxyline et l'éosine, afin de permettre la mise en évidence des noyaux (bleu pourpre) et du cytoplasme (rouge) lors de l'observation microscopique (Farias et *al*., 2014).

4. Etude de l'activité anti-inflammatoire de *Punica granatum* et de l'acide gallique *in vivo*

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* et de l'acide gallique, un modèle expérimentale d'inflammation aigue de la patte des rats induit par la carragénine a été sélectionné selon la méthode de (Winter et *al*., 1963). Pour cela, 12 rats ont été mis à jeune 12 heures avant l'essai et sont répartis en 4 lots de 3 rats chacun comme suit:

- **Lot 1 (Carragénine)** : Les rats reçoivent 0,1 ml de la carragénine à 1 % par injection sous cutanée sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite.
- **Lot 2 (Carragénine + Diclofénac)** : Les rats reçoivent 1 ml de diclofénac à 12 mg /kg par gavage gastrique 15 min après l'injection de la carragénine à 1 % en sous cutanée sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite
- **Lots 3 (Carragénine + EMEP)** : Les rats reçoivent 1 ml de l'extrait métanolique de l'écorce de *Punica granatum* à 200 mg /kg par gavage gastrique 15 min après l'injection sous cutanée de la carragénine à 1 % sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite.
- **Lot 4 (Carragénine + Acide gallique)** : Les rats reçoivent 1 ml de l'acide gallique à 200 mg /kg par gavage gastrique 15 min après l'injection sous cutanée de la carragénine à 1 % sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite. On considère la patte arrière gauche de chaque rat comme témoin.

L'œdème causé par la carragénine sera traduit en volume et sera mesuré par le pied à coulisse (*Digital Caliper*), ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire et de comparer cette activité à celle d'un anti-inflammatoire de référence, le diclofénac, chaque 15 min pendant 1h.

La mesure du pourcentage d'inhibition (% INH) de l'oedème de la patte arrière droite des rats traités par rapport au lot 1 traité par la carragénine seule permet d'evaluer l'activité anti-inflammatoire selon la formule suivante :

$$\% \text{ INH} = 100(VTf-VTP)/VTf$$

VTf : le volume de l'oedème chez les rats témoins ayant recu uniquement la carragénine 1% .

VTP : le volume de l'oedème chez les rats traités.

Le volume de l'odème VT à un temps t donné est calculé comme suit :

$$VT = Vt - V0$$

V0 : volume initial de l'œdème . **Vt :** volume du l'œdème au temps t.

5. Analyse statistique

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous forme de moyenne ± écartype. Nos résultats sont vérifiés par le test de *student* avec un seuil de signification supérieur à 95% ($p < 0.05$).

($P > 0.5$), effet non significatif ns.

($p < 0.05$), désigne effet significatif * ou #.

($p < 0.01$), désigne effet très significatif ** ou ##.

($p<0.001$), désigne effet hautement significatif *** ou ###.

(* comparaison avec le témoin) ou (# comparaison avec le lot traité par le diclofénac).

Résultats
&
Discussion

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité anti-ulcéreuse et anti-inflammatoire des composés phénoliques de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* (EMEP) et de l'acide gallique contre l'ulcère gastrique induit par le diclofénac *in vitro* et *in vivo*.

1. Etude phytochimique de *Punica granatum*

Les résultats de l'étude phyto-chimique de l'écorces de *Punica granatum* sont représentés ci-dessous.

1.1. Rendement d'extraction

L'extraction des principes actifs est effectuée par macération; opération qui consiste à laisser la poudre végétale en contact prolongé avec un solvant (méthanol) pour en extraire le maximum des principes actifs. L'évaporation à sec de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* a été effectuée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Boutch R-300). Les résultats du rendement d'extraction sont représentés dans le tableau 6 ci-dessous.

***Tableau 6**. Rendement d'extraction de l'extrait méthanolique de l'écorce de Punica granatum.*

L'échantillon	Poids de la poudre (g)	Poids de l'EMEP (g)	Rendement d'extraction (%)
EMEP	150	60.26	40.84%

D'après les résultats obtenus, le rendement d'extraction est important, il est de 40.48% par rapport au poids initial de la poudre végétale. L'extrait obtenu est de couleur marron foncé avec une odeur forte caractéristique de la plante. Des études ultérieures ont rapporté que les plantes ayant des rendements d'extraction élevés contiennent une forte teneur en composés phénoliques (Lehtinen et Laakso, 1998; Borneley et Peyrat-Maillard, 2000).

A partir des résultats obtenus, le rendement calculé est supérieur à celui rapporté par Prashanth et *al*., (2001), où le rendement de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* était de 30%. Et aussi mieux que celui trouvé par Li et ses collaborateurs (2006) où le rendement d'extraction était de 31.5 %. Dans l'étude d'Okonogi et *al*., (2007) et celle d'Iqbal et *al*., (2008), le rendement d'extraction était de 6.21% et 29% respectivement. Cette différence dans les rendements d'extraction est due à plusieurs facteurs entre autres la qualité d'échantillon, la distribution géographique et le solvant d'extraction utilisé.

L'efficacité de l'extraction par les solvants est influencée par de nombreux facteurs tel que : la nature et le volume du solvant utilisé, le pH du milieu d'extraction, la taille et la forme des particules et la température. Le caractère polaire des composés phénoliques conditionne le choix du solvant. La solubilité des polyphénols est étroitement liée au degré de polymérisation en raison de l'augmentation de nombre de groupement hydroxyles (Bonnaille et *al*., 2012).

1.2. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et en tanins hydrolysables

La spectrophotométrie permet de quantifier la teneur en composés phénoliques dans l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* exprimées en milligramme équivalent acide gallique, milligramme équivalent quercétine et en milligramme équivalent acide tannique par gramme d'échantillon pour les polyphénols, les flavonoides et les tanins hydrolysables respectivement. La quantification a été faite en se référant aux courbes d'étalonnages réalisées dans les mêmes conditions (Annexe 1, 2, 3). Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins hydrolysables, de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* sont représentées dans la figure 16.

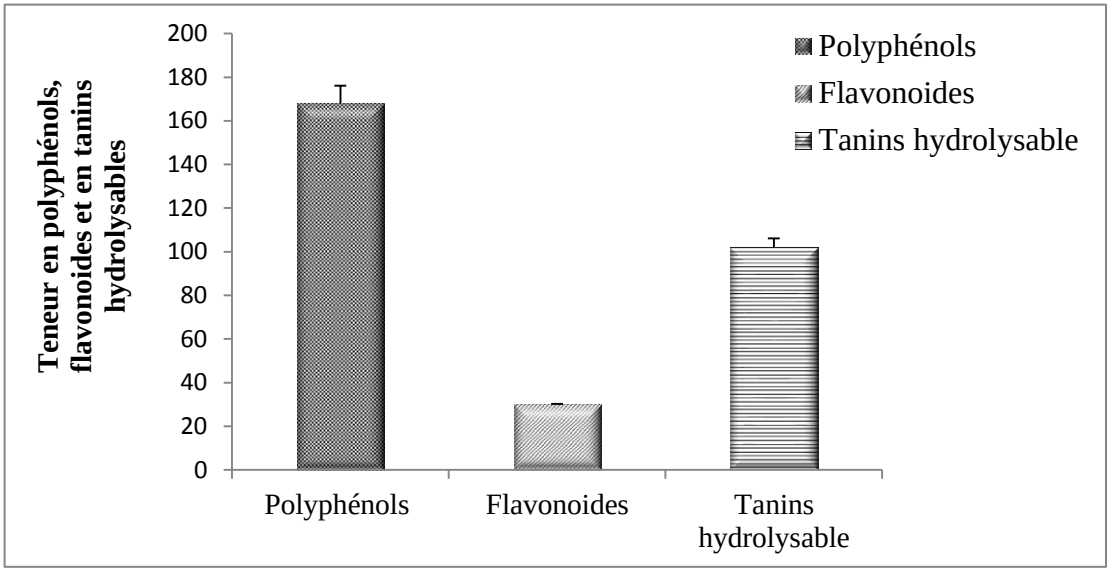


Figure 16. *Teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins hydrolysables de l'extrait méthanolique de l'écorce Punica granatum en mg EAG/g et mg EQ /g et mg EAT/g de Punica grantum respectivement.*

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade est riche en polyphénols totaux (168.09 ± 8.063 mg EAG/g de MS) et en tanins hydrolysables (102.4 ± 4.087mg EAT/g MS). Sa composition en flavonoïdes est relativement faible (30.195 ± 3.091 mg EQ/g MS).

Nos résultats sont significativement plus élevés que ceux rapportés par Elfalleh et *al*., (2012**)** avec une teneur en polyphénols de (85,60 ± 4,87 et 53,65 ± 4,1mg EAG /g) pour l' extrait méthanolique et aqueux de l'écorce de grenade respectivement. De plus, ces résultats sont confirmés par les

travaux de Douaouri et Djebli, (2018) qui ont rapporté une teneur en polyphénols de (227,92 ± 0,50 mg EAG/ g) dans l'extrait méthanolique de *Punica granatum*. Tehranifar et *al*., (2010) ont trouvés une teneur très élevée qui atteint 423.5 mg EAG/g des polyphénols dans l'extrait méthanolique de la plante.

Concernant le taux des flavonoides, nos résultats sont en accord avec ceux de Li et ses collaborateurs (2006), Douaouri et Djebli, (2018) qui rapportent un taux très faible de flavonoïdes dans l'extrait de l'écorce de grenade. En 2012 Shiban et ses collaborateurs ont montré que la teneur en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique était de 56,4 mg EQ/g, cette teneur est nettement supérieur à la valeur obtenue dans la présente étude (30.195 ± 3.091 mg EQ/g MS).

Il a été rapporté que l'extrait de l'écorce de grenade est riche en ellagitanins qui sont des tanins hydrolysables (Seeram et *al*., 2005). Douaouri et Djebli, (2018) ont montré que la teneur en tanins hydrolysables dans l'extrait méthanolique était de 214,28 ± 1,79 mg EAT/g. Ceci est significativement supérieur de la valeur obtenue dans la présente étude (102.4 ± 4.087mg EAT/g). Ces variations dans la teneur en composés phénoliques dépend du climat, la localisation géographique (Ryan et *al*., 1999 ; Benlarbi, 2004), maturité, conditions de stockage et les différentes maladies qui peuvent affecter la plante (Poyrazoglu et *al*., 2002). Les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins hydrolysables peuvent servir comme indicateurs importants des capacités thérapeutiques des plantes médicinales (Viuda-Martos et *al*., 2011).

1.3. Identification des composants de l'extrait méthanolique et éthanolique de l'écorce de *Punica granatum* par CG-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, qui permet la séparation des composés d'un échantillon et de la spectrométrie de masse, pour l'identification et la détection des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. Cette technique sert à identifier les diverses composantes dans leur spectre de masse (Arpino, 2015). Chaque composant a un spectre de masse unique, ou quasi unique, que l'on peut comparer avec les bases de données et donc permet d'identifier et de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces dans un mélange (Skoog et *al*., 2003). Les applications de la GC-MS comprennent le dosage de médicaments ou de stupéfiants, l'analyse des extraits des plants, la médecine légale et l'identification de toutes substances inconnues. La GC-MS est d'ailleurs présentée comme étant la référence absolue des analyses des échantillons biologique surtout en médecine légale (Skoog et *al*., 2003).

Le chromatogramme obtenu après analyse par CG-MS de l'extrait méthanolique de l'écorce de fruit de *Punica granatum* est représentée dans la figure 17 ci-dessous.

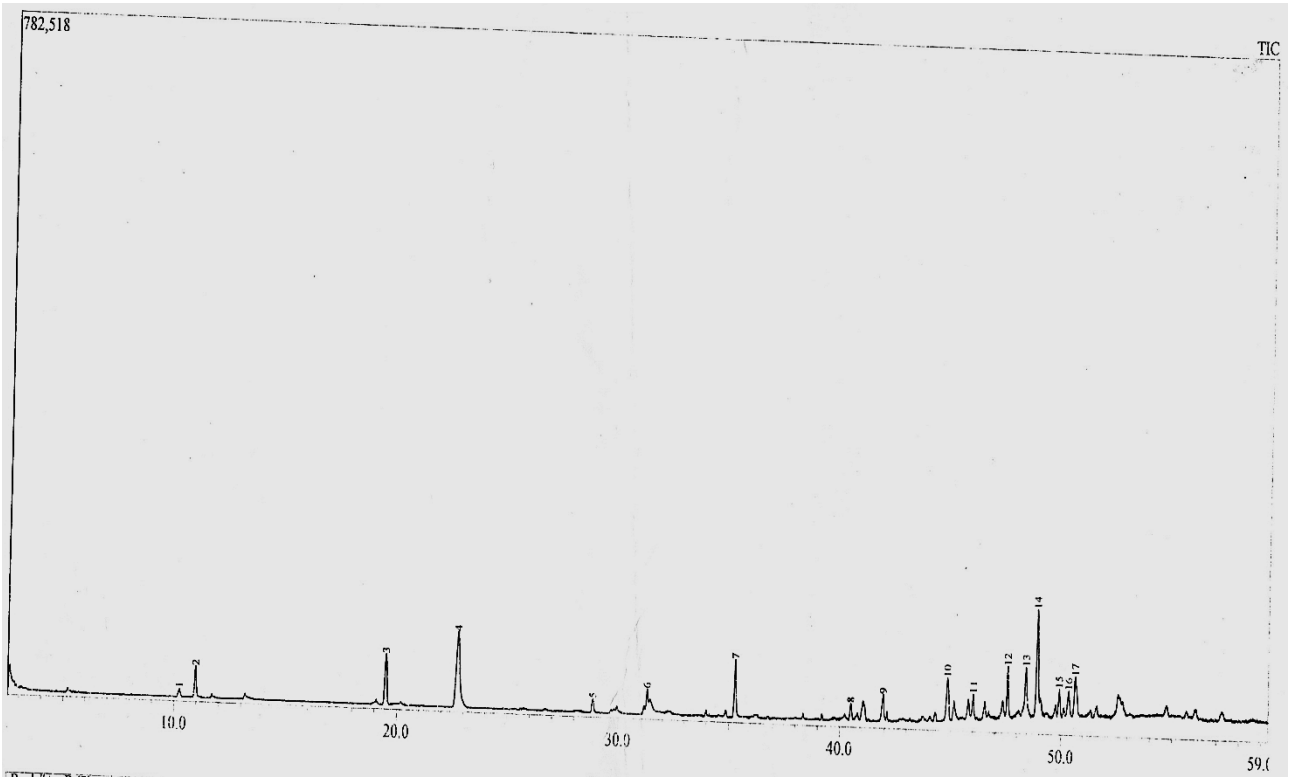


Figure 17 . *Chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'écorce de fruit de Punica granatum.*

Les antioxydants à base de plantes sont extraits des matières premières par les solvants organiques tels que le méthanol, éthanol et même l'eau. Le méthanol est un extracteur efficace pour une large gamme de polyphénols, donc c'est un solvant fréquemment utilisé à l'échelle de laboratoire et à l'échelle industrielle. Il est facilement accessible et à bon marché (Wang et *al.,* 2004).

L'analyse du chromatogramme obtenu a permis de révéler la présence de deux flavonoïdes la Pinostrobinchalcone à 12.55%, Flemichapparine à 6.78%, d'un acide phénolique l'acide Acetylferulique à 3.23%, des monoterpènes : Fenchane 3.69% et Tridecane, 1-iodo à 3.16%, un composé nitré à activité antiinflammatoire et anticancéreuse : 7,9-Dimethyl-8-nitrobicyclo [4.3.1] decan-10-one à 4.08%.

Le composé majoritaire (19.93%) est le 2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-, ou (hydroxyméthylfurfural : HMF) ; un composé naturellement présent en grandes quantités dans le café et les fruits séchés, et peut être présent en faible quantité dans le miel, les jus de fruits et le lait. Comme de nombreux composés responsables de goûts et de couleurs dans l'alimentation, le HMF est formé à partir de la déshydratation de certains sucres. Au cours des dernières décennies, il y a eu un débat intense concernant la toxicité, la mutagénicité et la cancérogénicité du 5-HMF (Abraham et *al.*, 2011; Capuano E., Fogliano, 2011. Malgré la préoccupation précédente sur les dangers du 5-

HMF, une théorie de l'activité biologique du 5-HMF a été acceptée ces dernières années. Il a été rapporté que 5-HMF a des effets biologiques favorables tels que l'activité anti-oxydante (Zhao et al., 2013) , anti-hypoxique (Li et al., 2011), et anti-anémique (Janzowski et al., 2000) . L'étude de Li et *al.*, (2015), a montré l'effet hépatoptecteur de du 5-HMF contre la toxicité induite par l'alcool via l'amélioration des paramètres de stress (SOD, CAT, Gpx et GSH GST, MDA) et la réduction des paramètres de l'inflammation : (TNF-α) et d'interleukine-1β (IL-1β) ont été significativement supprimés ($p < 0,05$).

L'odeur caractéristique de l'écorce de grenade est peut être due à la présence des monoterpenes dans l'EMEP). Le composé 3-Ethoxy-1, 1,1,7,7,7-hexamethyl-3, 5,5- tris (trimethylsiloxy) tetrasiloxane avec un pourcentage de 7.45% , est un composant important de plusieurs graines et fruits comme les graines des fruits de *Crataegus azarolus* (Bechkri et al., 2017). La composition chimique complète est représentée dans le tableau 7 ci –dessous.

***Tableau 7**. Composition de l' extrait méthanolique des écorces de Punica granatum après analyse par CG-MS.*

Pics	Tr (mn)	Composants	Pourcentage %
1	10.242	Acetamidoacetaldehyde	1.16
2	19.515	3-Ethoxy-1, 1, 1, 7, 7,7-hexamethyl-3, 5,5- tris (trimethylsiloxy) tetrasiloxane	7.42
3	22.752	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)- (5HMF)	19.93
4	28.852	Propnoicacid, 2-(aminooxy)-	1.65
5	31.323	Butane, 2-iodo-3-methyl-	3.00
6	35.282	Sucrose	6.85
7	40.491	1-Butanol, 4-butoxy-	2.16
8	41.950	Fenchane	3.69
9	44.841	Stearyliodide	7.08
10	46.011	Acetylferulic acid	3.23
11	47.011	Nonadecane	5.63
12	48.394	Flemichapparin	6.78
13	48.895	Pinostrobinchalcone	12.55
14	49.909	Tridecane, 1-iodo-	3.15
15	50.339	7,9-Dimethyl-8-nitrobicyclo [4.3.1] decan-10-one	4.08
16	50.634	Di-isooctyl phthalate	7.78

La composition de l'extrait éthanolique de *Punica granatum* est représentée dans la figure 18 et le tableau 8 ci-dessous.

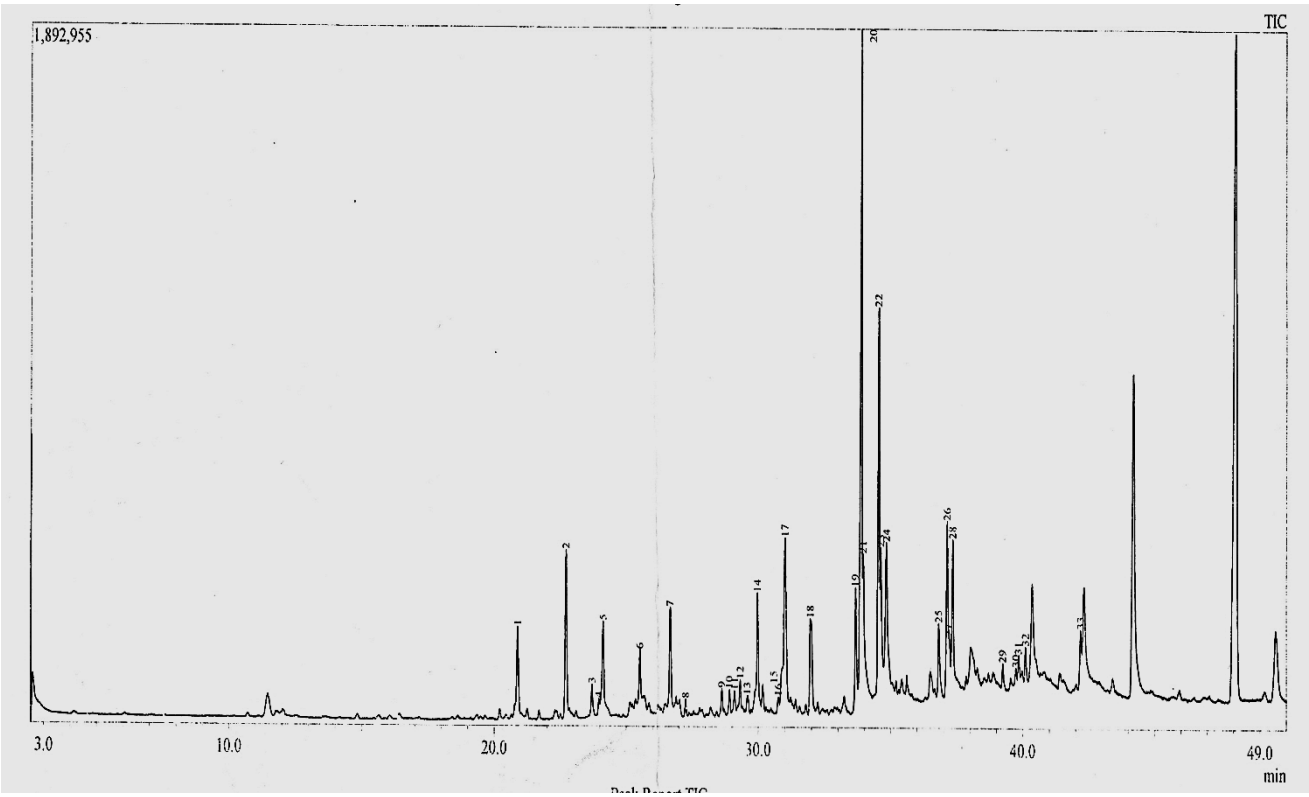


Figure 18 . *Chromatogramme de l'extrait éthanolique de l'écorce de fruit de Punica granatum.*

L'analyse du chromatogramme montre que l'extrait éthanolique est riche en terpènes (1-Nonadecene 2.68%, 1-Tridecene 0.34%, Phytol 0.61%), sesquiterpenes (Sesquiterpenealcohol, (R)-Cuparene 0.70%, Bergamotene 0.58%, et en acide gras suturés et insaturés (Acide palmitique 19.69%, acide myristique 3.11%, acide laurique 1.27%, Oléamide à 1.74% est un acide gras monoinsaturé (W-9) et un stéroide (Asterone 0.40%), des dérrivés d'acides gras (Palmitic acide methyl ester 6.84%, Cholesteryl myristate 0.70%, Methyl stearate 6.48%, Methyl oleate 11.26%, Isoamyllaurate (ester d'acide gras) à 2.20%).

Le phytol est un diterpene à activité anti-inflammatoire, anticancéreuse, antimicrobienne et antidiurétique (Mohan Das et *al.*, 2014). Le Bergamotene est un sesquiterpene à activité anti-inflammatoire, antioxydante et analgésique (pi et *al.*, 2015).

Les différences dans la composition chimique entre les deux extraits peuvent être expliquées par l'influence de la polarité des solvants d'extraction (Wang et *al.*, 2011).

Cette richesse dans la composition chimique de la plante peut expliquer leurs activités anti-radiculaire, anti-inflammatoire et anti-ulcérogène obtenus dans la présente étude.

***Tableau 8**. Composition chimique de l'extrait éthanolique de l'écorce de Punica granatum après analyse par CG-MS.*

Pics	Tr (mn)	Composants	Pourcentage %
1	20.885	l'alcool cétylique ou palmitique	2.45
2	22.709	1,3-Diacetylpropane	5.01
3	23.706	1-Hydroxy-2,4-di-tert-butylbenzene	0.64
4	23.958	Decane, 3,7-dimethyl-	0.35
5	24.122	Sesquiterpenealcohol	2.70
6	25.507	acide laurique	1.27
7	26.665	1-Nonadecene	2.68
8	27.249	1-Tridecen	0.34
9	28.624	Benzene, 1-acetyl-4-(4-propylcyclohexyl)-	0.56
10	28.911	Asterone	0.40
11	29.104	Cembrene	0.45
12	29.324	(R)-Cuparene	0.70
13	29.586	Bergamotene	0.58
14	29.979	acide myristique	3.11
15	30.176	Cholesteryl myristate	0.70
16	30.758	Cyclododecanemethanol	0.42
17	31.018	Palmitic acide methyl ester	6.84
18	31.969	L'acide pentadécanoïque	3.77
19	33.678	Cyclopentadecanone, 2-hydroxy-	3.55
20	33.892	Acide palmitique C16	19.69
21	34.538	Methyl oleate	11.26
22	34.626	Octadecenylaldehyde	4.35
23	34.834	Methyl stearate = metholene	6.48
24	36.819	Isoamyllaurate esters d'ag	2.20
25	37.132	Oleic Acid	6.03
26	37.217	9,17-Octadecadienal, (Z)-	0.86
27	37.335	Acide stéarique	3.90
28	39.235	Carbonic acid, isobutyl octadecyl ester	0.44
29	39.738	Tetratriacontane	0.33
30	39.839	Phytol	0.61
31	40.103	Isoamyllaurate ester	0.87
32	42.193	Oléamide acide gras monoinsaturé	1.74

2. Etude *in vitro* de l'activité anti-oxydante

2.1. Effet anti-radicalaire contre le radical libre DPPH°

La figure 19 montre les variations de l'effet scavenger de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* (EMEP), de l'acide gallique et de l'acide ascorbique à différentes concentrations contre le radical libre DPPH°.

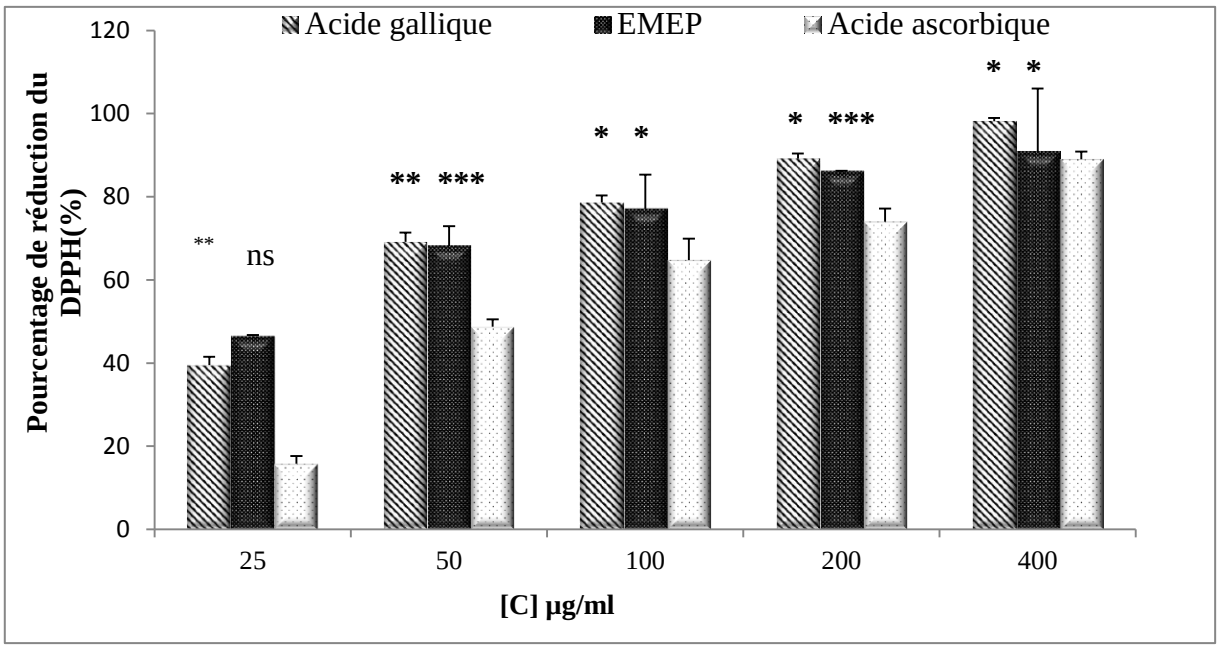


Figure 19. *Pourcentage de réduction du radical libre DPPH° par l'EMEP, l'acide gallique et l'acide ascorbique à différents concentrations.*

Le pouvoir anti-radicalaire de l'EMEP, d'acide gallique et de l'acide ascorbique aux concentrations 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml et 400 µg/ml a été évalué en se basant sur le pourcentage de réduction du radical libre DPPH°.

Les résultats ont révélé que les trois échantillons possèdent une activité anti-radicalaire concentration- dépendante. L'acide gallique a montré un effet mieux que celui obtenu avec l'acide ascorbique et avec l'EMEP. A la concentration de 400 µg/ml, l'acide gallique a donné l'effet le plus important 98.18% ± 0.78 par rapport à l'acide ascorbique avec un pourcentage de réduction de 89,02 % ± 1.86. Une expérience réalisée *in vitro* a montré que l'acide gallique exercer un bon effet anti-radicalaire (Asnaashari et *al*., 2014). Les résultats de Yen et *al*., (2002) suggèrent que l'AG à la concentration de 4,17 mM est capable de piéger 44 % des radicaux $DPPH^{\bullet}$.

Concernant l'EMEP, pour la concentration de 400 µg/ml, le pourcentage d'inhibition du DPPH° est de 90,18% ± 0,25. Cet extrait a le même ($p > 0.05$) effet que celui de l'acide ascorbique à la même

concentration. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par Zahin et *al.*, (2010) qui ont trouvé qu'à 80 µg /ml. Les extraits polyphénoliques de l'écorce de grenade a donné des capacités de réduction du radical DPPH° de l'ordre de 90,53%, 86,4% et 83,2% pour les fractions méthanoliques, acétoniques et éthanoliques respectivement. La teneur élevée en composés phénoliques contenue dans l'extrait methanolique de l'écorce de grenade obtenu dans cette étude peut expliquer sa forte activité anti-radicallaire. La Pinostrobinchalcone à 12.55%, Flemichapparine à 6.78%, l'acide acetylferulique à 3.23% et les es monoterpènes: Fenchane 3.69 % et Tridecane 1-iodo à 3.16% qui sont connus par ses propriétés anti-radicallaires. Selon l'étude d'Okongi et *al.*, (2007), portée sur les activités anti-oxydantes de certains extraits de l'écorce de fruit, l'écorce de grenade a montré l'activité de piégeage du radical DPPH° la plus élevée par rapport à celle de la banane et d'autres fruits. Les tiges et l'écorce du grenadier possèdent des propriétés anti-oxydantes très importantes selon Seeram et *al.*, (2006).En effet les travaux réalisés par Kang et *al.*, (2003) ont suggéré que les molécules polaires polyphénoliques contribuent à l'augmentation de l'activité anti-radicalaire. Reddy et *al.*, (2007) ont déclaré que les tanins totaux du fruits de grenade bruts et les constituants purifiés (par exemple l'acide ellagique, le punicalagines et l'acide gallique) possédaient une activité anti-oxydante et inhibaient fortement la production de ERO (Madrigal-Carballo et *al.*, 2009).

Nous avons déterminés pour chaque échantillon, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH ou IC50 à partir des équations de régressions linéaires. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité anti-oxydante d'un composé est grande (Hebi et Eddouks, 2016). Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 9 suivant :

Tableau 9. *IC50 de l'EMEP, de l'acide gallique et de l'acide ascorbique contre le radical DPPH°.*

	IC_{50} µg / ml
L'acide ascorbique	135,78
L'acide gallique	62,34
L'EMEP	58,16

En comparant les IC_{50} de l'EMEP et de l'acide gallique à celle de l'acide ascorbique, nous remarquons que l'activité anti-radicalaire de l'EMEP et de l'acide gallique est supérieure à celle de l'acide ascorbique. Les IC50 sont de l'ordre de 58,16 µg/ml et 62,34 µg/ml pour l'EMEP et l'acide gallique respectivement contre 137,78 µg/ml obtenu avec l'acide ascorbique. L'activité anti-radicalaire de l'EMEP est similaire à celle de l'acide gallique. Ces résultats sont comparable à ceux qui sont trouvées par Rajan et *al.*, (2011) qui ont démonté que les extraits aqueux et alcooliques de

l'écorce de grenade présentent un bon effet anti-radicalaire avec une IC_{50} entre 34,78 ±14,04 et 135,27± 35,5 µg/ml pour les extraits aqueux et entre 40,03 ± 14,72 à 105,93 ± 17,19 µg/ml pour les extraits alcooliques. Cependant on assiste à quelques différences en comparant nos résultats avec ceux de Madrigal-Carballo et *al*., (2009) qui ont démontré que l'extrait méthanoïque de l'écore de grenade présente une IC_{50} qui varie entre 0,33 et 11 µg/ml.

Les molécules anti-oxydantes telles que l'acide ascorbique, l'acide gallique, les flavonoïdes et les tanins réduisent le DPPH° en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Bougandoura et Bendimerad, 2012). Il est bien établi que l'activité anti-oxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent l'activité anti-radicalaire la plus élevée (Heim et *al*., 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes d'hydrogènes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de pinedo et *al*., 2007). L'activité anti-radicalaire est donc dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituant sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, glycosylés) et le degré de polymérisation (Popovici et *al*., 2010). Ainsi, l'effet anti-radicalaire n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Rodriguez-Bernaldo et *al*., 2010).

Galato et *al*., (2001) ont démontré que l'activité anti-oxydante d'une molécule augmente avec l'augmentation des nombres de groupements hydroxyles attachés à l'anneau aromatique (Sroka et Cisowski, 2003 ; Palafox-Carlos et *al*., 2012). En effet, l'acide gallique s'est avéré présenter la plus grande capacité anti-radicallaire parmi divers acides phénoliques (Palafox-Carlos et *al*., 2012). Teixeira et *al*., (2013) ont montré que l'efficacité de piégeage radicalaire des dérivés de l'acide gallique dépend de la présence des groupes hydroxyles, en particulier en position para. Auparavant, le rôle du groupe hydroxyle ortho dans l'activité anti-oxydante des acides phénoliques a été également décrit (Wright et *al*., 2001). Le groupe hydroxyle supplémentaire dans l'acide trihydroxyphénolique fournit une plus grande stabilité avec une activité anti-radicallaire plus élevée (Siquet et *al*., 2006).

2.2. Détermination du pouvoir réducteur (FRAP)

Le pouvoir réducteur est la capacité d'un extrait à donner un électron et à réduire le fer. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (Li et *al.*, 2007). Les résultats des pouvoirs réducteurs de l'EMEP, de l'acide gallique et de l'acide ascorbique à différente concentrations, sont représentés dans la figure 20.

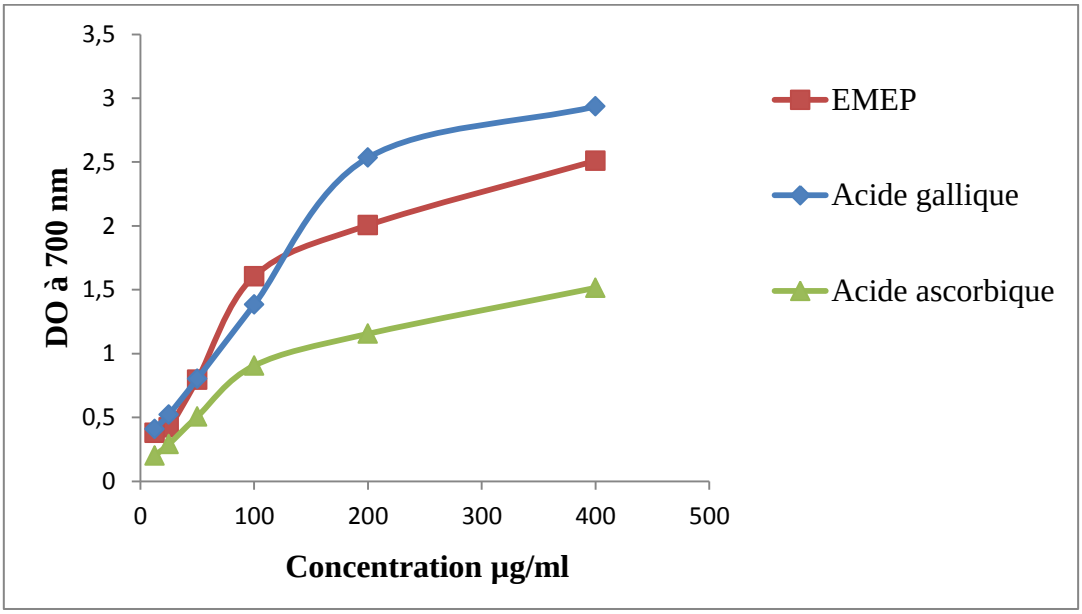


Figure 20. *Pouvoir réducteur de l'acide gallique, l'EMEP et de l'acide ascorbique à différentes concentration.*

La méthode de FRAP, est une technique facile, rapide et reproductible (Li et *al.*, 2007). Elle Permet de mesure la puissance des substances testées à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+}. La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité anti-oxydante potentielle. Beaucoup de publications actuelles ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités anti-oxydantes et la puissance de réduction des composants des plantes.

Nos résultats ont montré que l'EMEP et de l'acide gallique présentent une importante capacité de réduction du fer concentration-dépendante et supérieure à celle obtenus avec la référence (acide ascorbique) aux mêmes concentrations. Si nous classons nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique, nous obtiendrons l'ordre suivant : acide gallique > EMEP> l'acide ascorbique. Nos résultats sont similaires à ceux de Marxen et *al.*, (2007) et Su et *al.*, (2008).

Le meilleur effet obtenu avec l'AG, en réduisant le Fe^{+3} en Fe^{+2} et protégé ainsi contre le stress oxydatif médié par le OH°. La structure de l'AG montre que le cycle aromatique contient un groupement acide carboxylique et trois groupements hydroxyles en positions 3, 4 et 5 du cycle aromatique. Le groupe hydroxy en position 3 de ce type de composé peut se débarrasser de l'hypochlorite hautement oxydant (Firuzi et *al.*, 2004) et des radicaux libres tels que le radical peroxyle (Ioku et *al.*, 1995), le peroxynitrite (Haenen et *al.*, 1997) et le radical superoxyde (Sichel et *al.*, 1991). Les propriétés de chélation du fer et de piégeage des radicaux libres de l'AG et de l'EMEP obtenues *in vitro* seront exploitées pour évaluer leurs effets gastro-protecteurs *in vivo.*

3. Etude *in vivo* : Evaluation de l'effet gastro-protecteur de l'EMEP et de l'acide gallique

3.1. Paramètres gastriques

L'ulcère se traduit par la réduction de la production du mucus (Barros et *al*., 2008; Metowogo et *al*., 2009), associée à une diminution des taux des prostaglandines qui sont des facteurs gastro-protecteurs importants (Bafna et Balaraman, 2004; Rozza et *al*., 2012). Et l'augmentation des facteurs agressifs à savoir le volume de jus gastrique et l'acidité totale. Pour mettre en évidence l'effet gastroprotecteur de l'EMEP et de l'acide gallique, quelques paramètres gastriques sont évalués :

3.1.1. Etude macroscopique

Les différences macroscopiques et les types de lésions gastriques observés chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique à (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg), pendant 3 jours, sont représentées dans la figure 21.

Macroscopiquement, de nombreuses lésions profondes, des ulcérations et des hémorragies de la muqueuses gastrique au niveau de la portion glandulaire ont été enregistré chez les rats traités par le diclofénac seule à (150mg/kg) dès la quatrième heure de leur administration **(B)**, par rapport aux estomacs des rats traités par le véhicule **(A)**, où la muqueuse gastrique présente un aspect normal et sain, résultats montrant l'effet ulcérogène du diclofenac. Ces observations sont identiques à ceux obtenues par Saiah et *al*., (2017) qui ont effectués le même modèle d'ulcère. D'après Roy et ses collaborateurs (2015), le diclofénac est associé à de graves effets indésirables gastro-intestinaux, apparaissent en raison de la réduction de la sécrétion de mucus et de bicarbonate qui protègent la muqueuse gastrique contre les lésions à cause de la diminution de synthèse des prostaglandines (Sinha et *al*., 2013).

Chez les rats prétraités par l'EMEP à 100 mg/kg **(C)**, une protection se traduisant par la réduction nette des lésions gastriques par rapport à celles signalées sous l'effet du diclofénac seul a été enregistrée **(B)**, ces lésions étaient superficielles, et peu nombreuses. Ces observations confirment celles obtenues par Moghaddam et *al*., (2013).

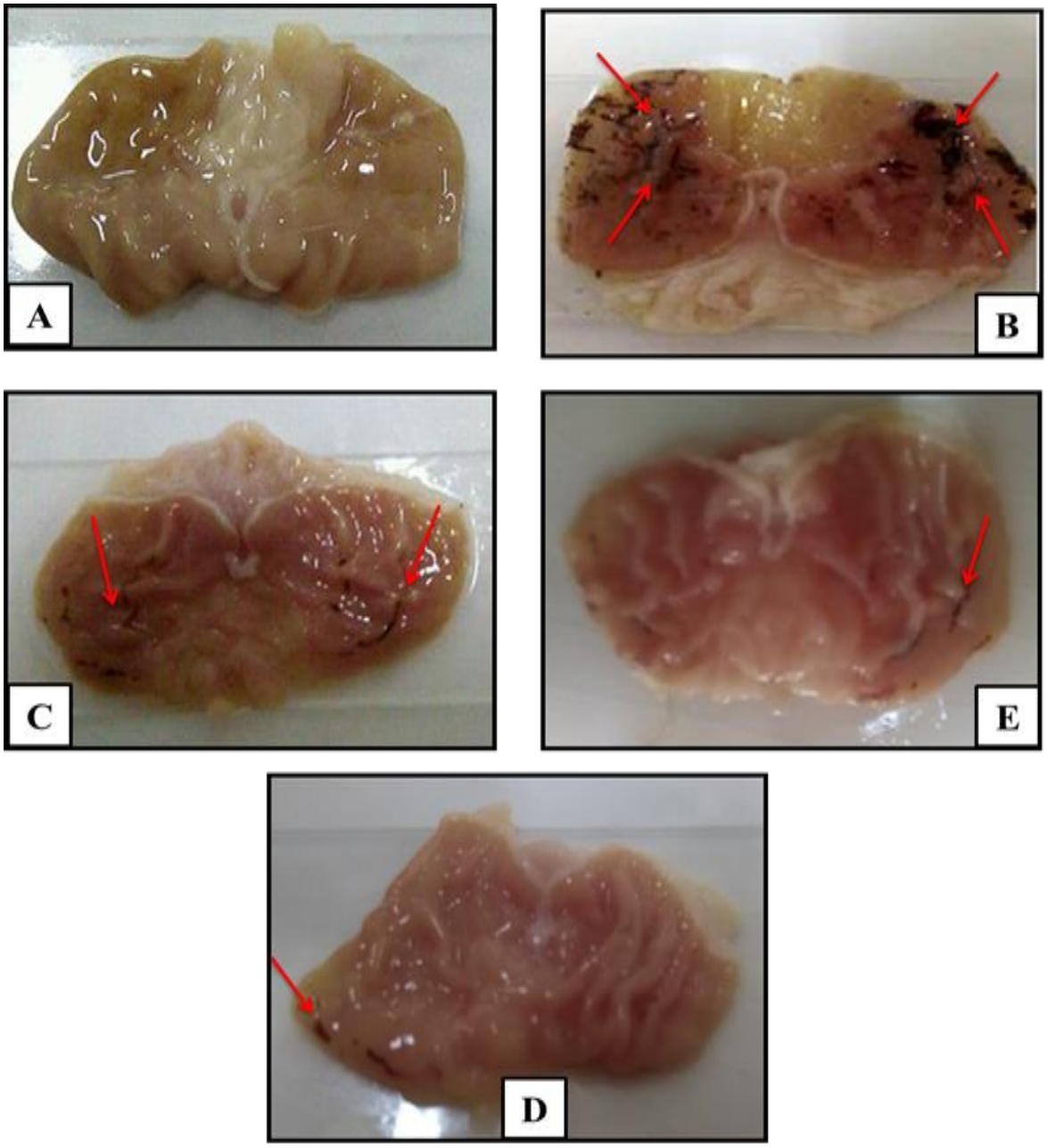


***Figure 21**. Macroscopie des estomacs des rats **(A)** : Témoins traités par le véhicule.*

***(B)**: Traités par diclofénac seul 150mg/kg. **(C)**: Prétraités par EMEP à 100mg/kg. **(D)**: Prétraités par oméprazole à 20 mg/kg. **(E)**: Prétraités par l'acide gallique à 100mg/kg.*

Ces résultats justifient l'utilisation traditionnelle de l'écorce de grenade pour traiter les ulcères gastriques. L'EMEP exercerait donc son effet gastro-protecteur soit via l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire des polyphénols et des tanins constitutifs (Gil et *al*., 2000 ; Bagri et *al*., 2010 ; Arshad et *al*., 2017). Soit par leur action inhibitrice sur la libération d'histamine qui stimule la sécrétion du suc gastrique.

Le co-traitement par l'acide gallique à 100 mg/kg (E) a montré une bonne protection gastrique malgré la présence de quelques lésions qui restent limitées à une petite portion de l'estomac. Ces observations macroscopiques sont très proches aux observations réalisées par Sen et *al*., (2013). Cet effet gastroprotecteur est probablement due à leurs propriétés anti-ulcéreuses, antioxydants (Yen et al., 2002) et anti-inflammatoires (Sowndhar Rajan et *al*., 2018). De même les rats prétraités par l'oméprazole à 20 mg/kg (D) ont développé une protection contre l'ulcère avec des lésions assez bien limitées, par apport au groupe ulcéré (B). Ce qui confirme les données théoriques rapportés par Brooks et Watson (1997).

3.1.2. Indice d'ulcère et pourcentage de protection

Après observation macroscopique, la détermination du nombre et du grade des lésions observées, nous a permis de calculer l'indice d'ulcère et le pourcentage de protection sous l'effet des différents traitements. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10. *Indice d'ulcère et pourcentage de protection chez les rats traités par le diclofénac seul ou en cas de prétraitement par l'EMEP, l'acide gallique (100mg/kg) ou l'oméprazole (20mg/kg) pendant 3 jours.*

	Témoin	**DCF**	**EMEP+ DCF**	**AG + DCF**	**OME+ DCF**
Indice d'ulcère (IU)	0	$5.4 \pm 0.42^{\#\#}$	$1.46 \pm 0.25^{***}$	$1.45 \pm 0.07^{**}$	$1.15 \pm 0.07^{**}$
% de protection	100	0	73.08	73.39	78.89

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student: comparaison faites entre le groupe traité par DCF seul et le groupe témoin : $^{\#\#}P< 0.01$, désigne effet très significatif. Groupe prétraité comparé au groupe DCF: $^{**}P< 0.01$, désigne effet très significatif, $^{***}P<0.001$, désigne effet hautement significatif.

Le traitement par le DCF à (150 mg/kg) a provoqué des lésions de la muqueuse gastrique se traduisant par une augmentation très significative ($P<0.01$) de l'indice d'ulcère (IU= 5.4 ± 0.42) par rapport au groupe témoin. Cependant le prétraitement par l'EMEP à (100mg/kg) a réduit de manière hautement significative ($P<0.001$) la sévérité des lésions gastriques dont l'indice d'ulcère est de 1.46 ± 0.25 avec un taux de réduction de 73.08% par rapport au groupe DCF. Le prétraitement par l'acide gallique à (100 mg/kg) a réduit l'indice d'ulcère de manière très significative ($P < 0.01$) à 1.45 ± 0.07 contre 5.4 ± 0.42 observé sous l'effet du traitement par le diclofénac seul, avec un taux de protection de 73.39%. L'effet de l'acide gallique est comparable ($p>0.05$) à celui de l'EMEP avec un taux de protection de 73.39%. L'oméprazole à (20 mg/kg) utilisé comme médicament de

référence a montré une réduction très significative (P<0.01) de l'indice d'ulcère atteint 1.15 ± 0.07 reflétant une protection de 78.89%.

Les pourcentages de protection obtenus dans cette étude sont mieux que ceux rapportés par Ajaikumar et ses collaborateurs (2005). Ils ont démontré que l'extrait de l'écorce de grenade aux doses 250 et 500 mg/kg possédait respectivement une protection de 22,37% et 74,21% contre l'ulcère gastrique induit par l'aspirine et de 21,95% et 63,41% contre l'ulcère induit par l'éthanol. Cette protection gastrique pourrait être le résultat de l'activité anti-oxydante (Pinheiro et *al*., 2018 ; Farhoosha et Nyströmb, 2018), et anti-inflammatoire d'une part (Bagri et *al*., 2010; Ben Saad et *al*., 2017 ; Sowndhar-Rajan et *al*., 2018) ou de l'activité cicatrisante de l'EMEP et de l'acide gallique d'autre part.

3.1.3. Productions de mucus

La production de mucus gastrique a été évaluée dans le cas de l'ulcère gastrique induit par le diclofénac en présence et en absence de l'acide gallique, de l'EMEP et de l'oméprazole. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 22 ci-dessous.

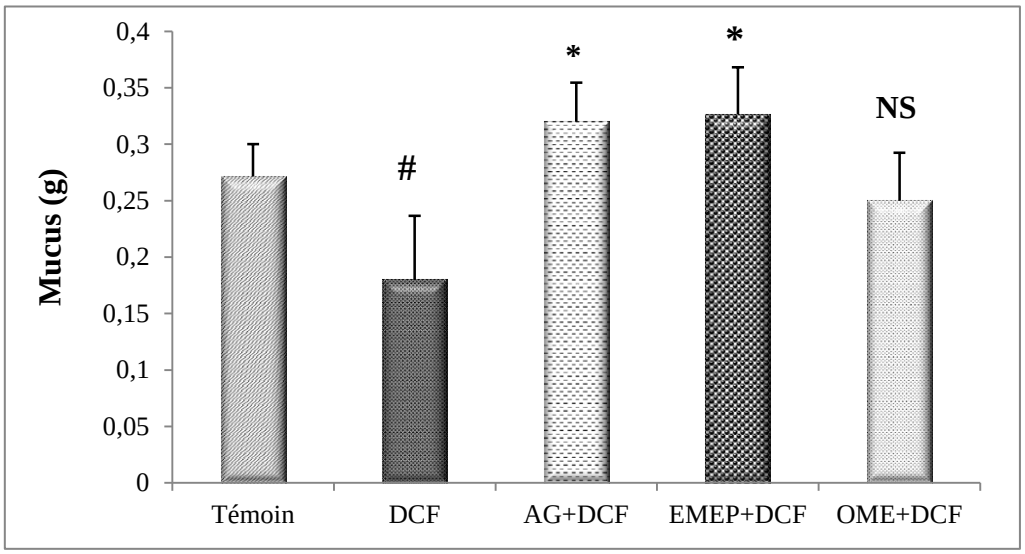


Figure 22. *Production de mucus chez les rats traités par le diclofénac seul ou en cas de prétraitement par EMEP, acide gallique (100mg/kg)ou l' oméprazole (20mg/kg) pendant 3 jours.*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par DCF et Témoin : $^{\#}$ *P≤ 0,05 désigne un effet significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traitépar DCF :* **P ≤ 0,05 désigne un effet significatif,* ^{NS}*P >0,05 désigne un effet non significatif.*

Nous avons enregistré une réduction significative (P≤ 0,05) de la quantité de mucus chez les rats traités par le diclofénac. Cette quantité est de 0,18 ± 0,056 g contre 0,27 ± 0,028 g chez les rats

témoins. Le prétraitement par l'EMEP (100mg/kg) ou par l'acide gallique (100mg/kg) a conduit à une augmentation significative ($P < 0,05$) de la production de mucus, qui atteint 0,326 ± 0,041 et 0,32 ± 0,035 g respectivement. Le prétraitement par l'oméprazole a provoqué une augmentation non significative ($P > 0,05$) de la production de mucus avec (0,25 ± 0,042 g) par rapport aux rats traités par le diclofénac seul.

La diminution de la production de mucus chez le groupe traité par le diclofénac est peut être due à l'inhibition des enzymes clés de la production de mucus et l'interférence avec la synthèse des prostaglandines par voie de la cyclooxygénase. La diminution de la synthèse des prostaglandines affecte la sécrétion de mucus qui a pour but de diminuer la diffusion des ions H^+ vers la lumière gastrique et duodénale protégeant de ce fait la muqueuse gastrique. Lors de l'ulcère gastrique induit par le DCF, la quantité du mucus est plus faible, la proportion de glycoprotéines diminue et ainsi la barrière mucus perde sa capacité à diminuer la rétrodiffusion des ions H^+ (Bouarioua et *al*., 2007). Contrairement, le prétraitement par l'EMEP a amélioré la protection gastrique par la stimulation de la sécrétion des glycoprotéines. L'EMEP peut également exercer une protection physique sur le mucus en empêchant les protons H^+ de se diffuser dans la paroi gastrique. Ces résultats rejoignent l'hypothèse de Fokou (2011), montrant que l'acide gallique agit directement en diminuant le transport des ions H^+. Au niveau des cellules épithéliales, il augmente le taux de la mucine, des phospholipides et la sécrétion de bicarbonate (Scheiman et Nsaid, 1996). A l'inverse le prétraitement par l'oméprazole n'affecte pas la production de mucus, car l'oméprazole est un puissant inhibiteur des sécrétions acide, leur effet s'exerce sur la pompe $H^{+/}K^+$ ATPase.

3.1.4. Volume de jus gastrique

Le suc gastrique est un le liquide biologique produit par les glandes de la paroi de l'estomac. Il participe à la digestion des aliments pour être absorbés par les villosités intestinales (Bazin et Lamarque, 2018). Les variations du volume de jus gastrique, chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique à (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg), pendant 3 jours, sont illustrés dans la figure 23.

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré une augmentation significative ($P \leq 0,05$) du volume de jus gastrique chez les rats traités par le diclofénac, atteint 300 ± 70,71µl contre 88,5 ± 2,12 µl mesuré chez le témoin. Ce volume diminue de façon significative ($P \leq 0,05$), en cas de prétraitement par l'EMEP et par l'acide gallique, les valeurs enregistrées sont de l'ordre de 190 ± 26,45 µl et 146,66 ± 30,55 µl respectivement. Une réduction très significative a été chez les rats prétraités par l'oméprazole, le volume est diminué de façon assez plus (22,5± 10,6 µl).

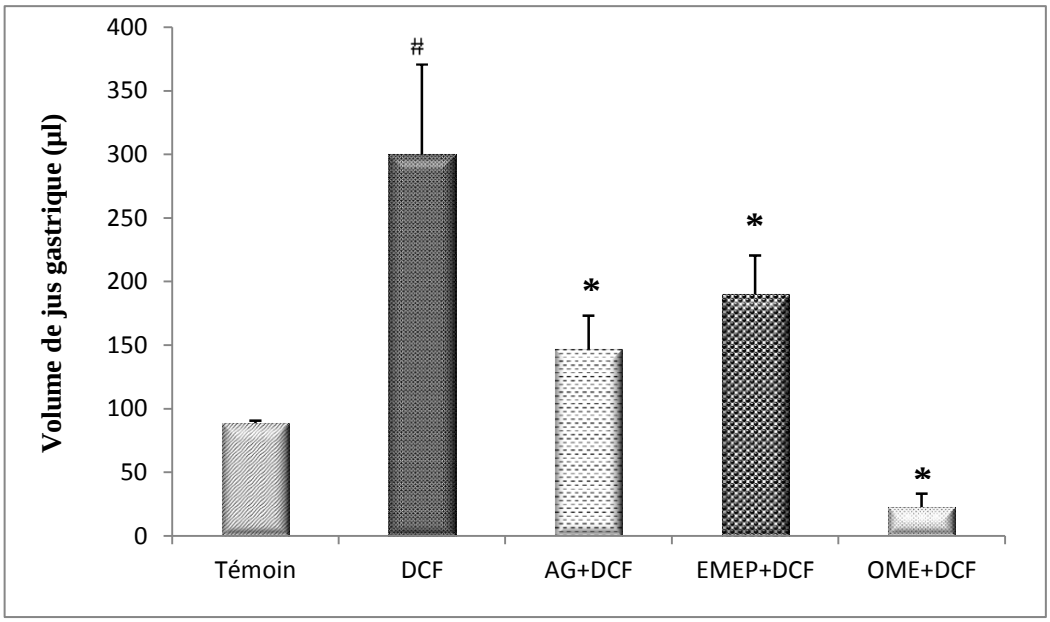


Figure 23. *Volume de jus gastrique, chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique à (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg)*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin : $^{\#}P \leq 0,05$ *désigne un effet significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac :* $^{*}P \leq 0,05$ *désigne un effet significatif.*

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que l'oméprazole possède des propriétés gastro-protectrices plus marquées que l'EMEP et aussi plus que l'acide gallique, par la réduction des sécrétions gastriques. Selon Sherwood (2006), un ulcère survient quand il y a un déséquilibre entre les facteurs agressifs et les facteurs protecteurs, le volume de suc gastrique est considéré comme agent agressif sur la muqueuse de l'estomac en faveur des lésions plus au moins grave. Autrement dit, la barrière muqueuse est franchie par les sécrétions acides et les pepsines. Ces résultats sont expliqués par l'effet de l'oméprazole, un inhibiteur de la pompe à protons gastrique (H^+/K^+ ATPase), et catalyseur de l'échange des ions H^+ et K^+. Ceci entraîne une inhibition efficace de la sécrétion acide.

La réduction des volumes du jus gastrique sous l'effet des polyphénols est peut être liée à l'effet antisecrétoire et anti-inflammatoire des flavonoïdes. Les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par l'inhibition de l'activité des enzymes responsables des états inflammatoires (Kim et *al*, 2004; Ben-Saad et *al*., 2017 ; Sowndhar-Rajan et *al*., 2018). Certains flavonoïdes (flavones et flavonols) sont capables d'inhiber l'histamine, un puissant stimulant de la sécrétion gastrique. La diminution de volume de suc gastrique chez les rats prétraités par l'acide gallique à 100 mg/kg, est due à son effet gastroptecteur confirmé par l'étude de Arshad et *al*., (2017).

3.1.5. Acidité gastrique

L'acidité gastrique, provient de l'acide gastrique qui est l'un des principaux acteurs de la digestion, et un des éléments qui compose le suc gastrique. C'est une solution d'acide chlorhydrique produite par les cellules de la paroi de l'estomac. Cet acide réduit la taille des aliments digérés dans l'estomac pour qu'ils puissent prendre une forme assimilable par l'organisme. En cas d'ulcère, le PH gastrique diminue, et l'acidité augmente ce qui va aggraver les lésions de la muqueuse.

Les variations de l'acidité gastrique chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique à (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg) pendant 3 jours, sont regroupés dans le tableau 11 ci-dessous.

***Tableau 11**. Variations de l'acidité chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique à (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg), pendant 3 jours.*

	Témoin	**DCF**	**DCF+AG**	**DCF+EMEP**	**DCF+OME**
Acidité (µEq/ml)	0,885 ± 0,02	3 ± 0,7 $^{\#}$	1,46 ± 0,3 *	1,866 ± 0,2*	0,225 ± 0,1*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin :$^{\#}$ P≤ 0,05 désigne un effet significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac : *P ≤ 0,05 désigne un effet significatif.

Les résultats obtenus montrent que l'acidité gastrique augmente de façon significative ($p<0.05$) chez les rats traités par le diclofénac avec une valeur de (3 ± 0,7 µEq/ml) contre (0,885 ± 0,02 µEq/ml) obtenu avec le témoin. Le prétraitement par l'EMEP ou par l'acide gallique, réduit significativement ($p<0.05$) cette acidité dont les valeurs égales respectivement 1.46 ± 0.3 µ Eq/ml et 1.866 ± 0.2 µEq/ml. De même pour l'oméprazole, l'acidité gastrique diminue de façon significative ($p<0.05$) et atteint 0,225 ± 0,1 µEq/ml à cause de l'inhibition de la pompe à proton. D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'EMEP et l'acide gallique possèdent une activité anti-ulcérogène *via* la réduction de l'acidité totale.

L'étude des paramètres gastriques montrent que l'administration de DCF chez les rats par voie orale induit l'augmentation de l'indice d'ulcère, le volume de suc gastrique et l'acidité totale et diminue la production du mucus, ce qui conduit à la génération des lésions au niveau tissulaire. Le DCF est bien connu pour son effet ulcérogène sur la muqueuse gastrique (Saiah et *al*., 2017).

3.2. Variation de taux de la protéine C réactive (CRP)

L'ulcère gastrique correspond à une inflammation de la muqueuse de l'estomac. Cette inflammation est caractérisé par une sécrétion accru des médiateurs pro-inflammatoires telle que : les interleukines IL1, IL 6 et le TNFα. Ces médiateurs stimulent les hépatocytes pour synthétiser la protéine C réactive. La CRP se définit comme étant un indicateur de l'inflammation apparaissant dans le sang dès l'introduction d'un antigène dans l'organisme. Elle disparaît après la formation des anticorps. Le tableau 12 ci-dessous représente la concentration de la CRP après traitement par le diclofénac seul (150 mg/kg), ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (100mg/kg) ou l'oméprazole (20mg/kg).

Tableau 12. *Variations de la CRP chez les rats traités par le diclofénac seul à (150 mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP à (100 mg/kg), l'acide gallique à (100 mg/kg) ou par l'oméprazole (20 mg/kg).*

Lot	CRP (mg/l)
Témoin	1 ± 0
Diclofénac (150mg/kg)	7,475 ±0,74 ##
Acide gallique (100 mg/kg)	3,7 ±0,63 *
EMEP (100 mg/kg)	2,775 ±1,025 *
Oméprazole 20 mg/kg	4,1± 0,49 *

*Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin : ## P≤ 0,01 désigne un effet très significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac : *P ≤ 0,05 désigne un effet significatif.*

D'après les résultats obtenus on observe une augmentation très significative (P≤ 0,01) de la concentration de la CRP chez les rats traités par le diclofénac (7,475 ±0,74mg/l) par rapport aux rats témoins (1mg/l). Le prétraitement des rats par l'EMEP, l'acide gallique ou l'oméprazole a diminué la concentration de la CRP de façon significative (P ≤ 0,05), elle atteint 3,7±0,63mg/l ; 2,775 ± 1,025 mg/l et 4,1± 0,49 mg/l respectivement par rapport aux rats traités par le diclofénac seul (7,475 ±0,74mg/l).

A l'état normal, la CRP existe sous forme de trace dans le sang, mais quelques minutes après l'événement aigu, une blessure, une inflammation ou une infection, on observe très rapidement une augmentation de la concentration de cette protéine jusqu'à 1000 fois sa concentration initiale (Otterness et *al*., 1994). La réduction de l'inflammation sous l'effet de l'acide gallique et de l'EMEP se traduit par la réduction significative de la CRP.

3.3. Evaluation du stress oxydant gastrique

3.3.1. Dosage du glutathion

La cellule dispose pour sa protection au glutathion, thiol intracellulaire vital qui constitue un acteur essentiel de la défense antioxydante cellulaire en se liant par son pôle SH aux métabolites toxiques. Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telle que la Gpx et la GST (Kebsa, 2006). Le GSH est la première ligne des mécanismes de défense cellulaire contre les dommages oxydatifs (El-Missiry et *al*., 2001).

Les variations des taux du GSH cytosolique gastrique après après traitement par le diclofénac à (150 mg/ml), ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (100mg/kg) ou avec l'oméprazole (20 mg/kg) pendant 3 jours sont présentées dans la figure 24 ci-dessous.

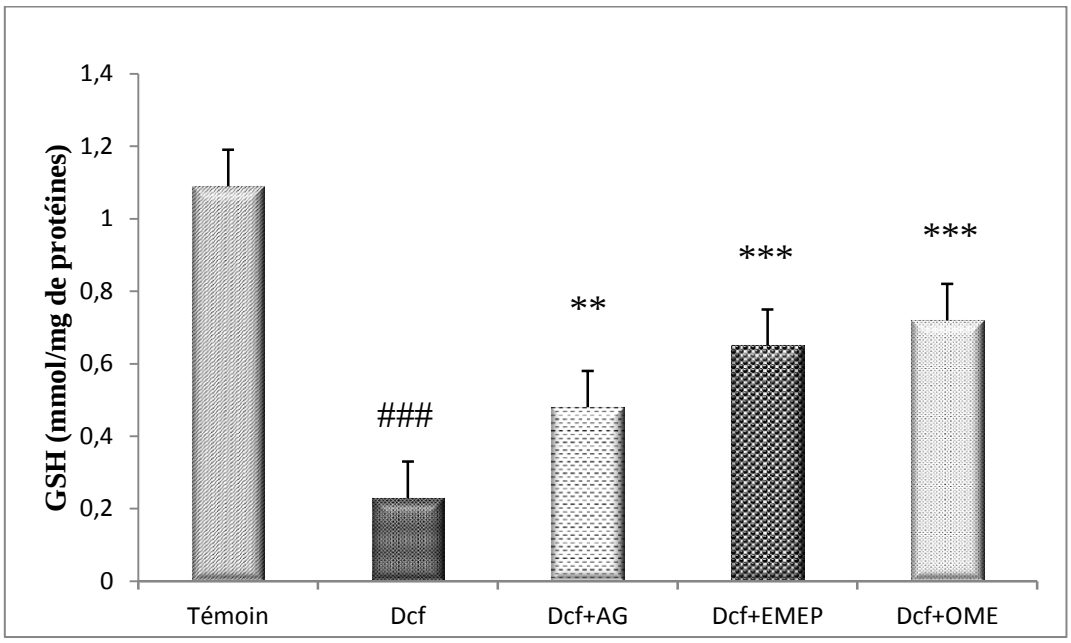


Figure 24. *Variation des taux du GSH cytosolique gastrique après traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg) pendant 3 jours.*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin $^{\#\#\#}P\leq 0,001$ désigne un effet hautement significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac : $^{**}P\leq 0,01$ désigne un effet très significatif, $^{***}P\leq 0,001$ désigne un effet hautement significatif.

D'après les résultats obtenus, les rats traités par le diclofénac présentent une diminution hautement significative ($P\leq 0,001$) de 78,89% qui atteint 0,23±0,001 mmol/mg de protéines contre 1,09±0,028 mmol/mg de protéines enregistrés chez le témoin. Le taux de GSH augmente de façon très significative ($P\leq 0,01$) chez les rats prétraitées par l'acide gallique (0,48 ± 0,0125 mmol/mg de

protéines) et de façon hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les rats prétraitées par l'EMEP (0,65 ± 0,0045) ou par l'oméprazole (0,75 ± 0,0041) par rapport aux rats traités par le diclofénac seul. Les pourcentages de l'augmentation sont dans l'ordre de 64,61%, 52,08 et 69,33 % pour l'EMEP, l'acide gallique et l'oméprazole respectivement.

Le glutathion réduit se trouve en concentration élevée dans la muqueuse gastrique (Saiah et *al*., 2017). Il est important pour le maintien de l'intégrité de la muqueuse, et sa déplétion induit des ulcérations accrues au niveau de la muqueuse gastrique (Cnubben et *al*., 2001; Devi et *al*., 2007 ; Saiah et *al*., 2017).

La diminution des taux de GSH chez les rats traités par le diclofénac, peut être liée à la consommation de GSH par la GST pour la neutralisation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Farzaei et *al*., 2015). Cet effondrement est peut-être dû également à sa conjugaison directe avec les espèces radicalaires ou en raison de l'inhibition des enzymes impliquées dans sa régénération. Le prétraitement par l'EMEP, l'acide gallique ou l'oméprazole augmente la concentration du GSH, cela montre leurs effets préventifs contre la déplétion du GSH induite par diclofenac. Cette augmentation des taux du GSH, est peut être due à l'induction de sa synthèse, sa régénération ou aux deux effets. Comme elle peut être due à l'effet scavenger des flavonoïdes des métabolites réactifs toxiques du médicament (Kebsa, 2006).

3.3.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique est le processus de dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés des membranes biologiques qui provoque une altération de la fonction membranaire, une détérioration de l'intégrité structurale, une diminution de la fluidité et l'inactivation d'un certain nombre de récepteurs protéiques et d'enzymes liées aux membranes (Sibi et *al*., 2016). Au cours de ce processus, un grand nombre de sous-produits sont formés qui affectent un site loin de la zone de leur génération, parmi ces dérivés toxiques, le MDA est le marqueur le plus utilisé en péroxydation lipidique, a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres. Il diffuse facilement et peut former des liaisons avec les bases d'ADN, il est lui-même mutagène (Milane, 2004).

La figure 25 représente les variations des taux du MDA cytosolique gastrique après traitement par le diclofénac seul (150 mg/kg), ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (100mg/kg) ou l'oméprazole (20mg/kg) pendant 3 jours.

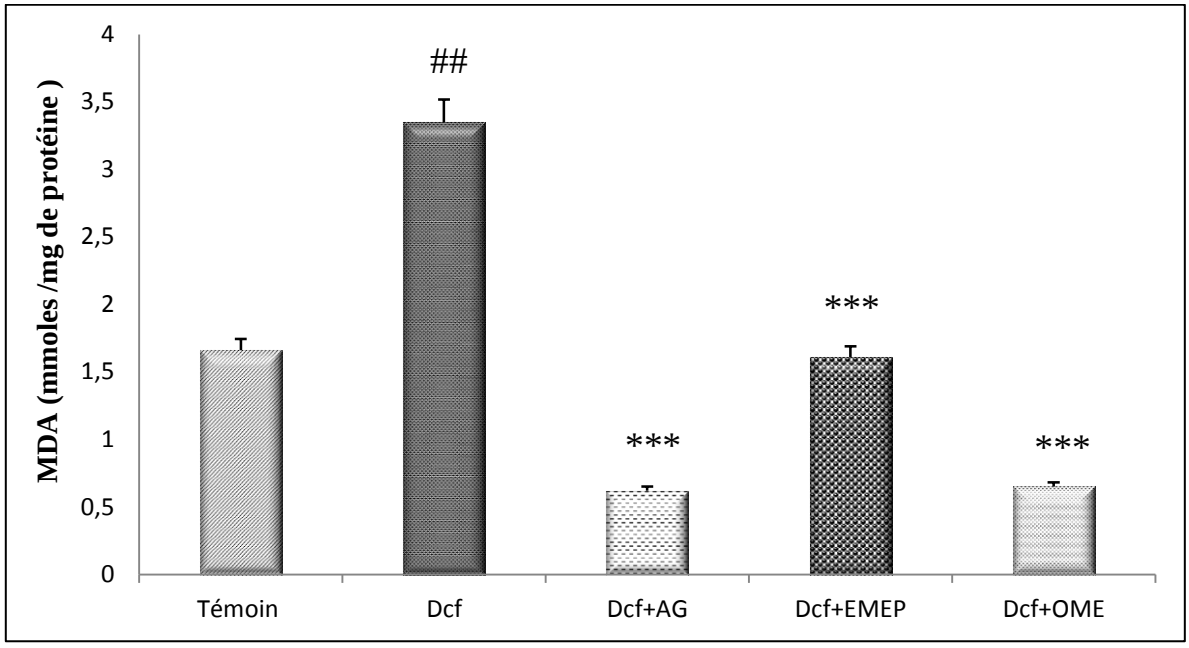


Figure 25. *Variations des taux du MDA cytosolique gastrique après traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg) pendant 3 jours.*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin : $^{\#\#}P\leq 0,01$ désigne un effet très significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac : $^{***}P\leq 0,001$ désigne un effet hautement significatif.

D'après les résultats obtenus, les rats traités par le diclofénac présentent une augmentation très significative (P≤ 0,01) de 50,45 % des taux du MDA qui atteint 3,35± 0,0046 mmoles/mg de protéines contre 1,66 ± 0,005 mmoles/mg de protéines chez les rats témoins. ce résultat est similaire à celui obtenu par (Devi et *al*., 2007; Saiah et *al*., 2017). Le taux de MDA diminue de façon hautement significative (P≤ 0,001) chez les rats prétraités par l'EMEP (1,61± 0,0013), l'acide gallique (0,62± 0,0043) et l'oméprazole (0,65 ± 0,0014) par rapport aux rats traités par le diclofénac seul. Les pourcentages de diminution sont dans l'ordre de 51,94 %, 81 % et 80,59 % pour l'EMEP, l'acide gallique et l'oméprazole.

L'augmentation des taux du MDA chez les rats traités par le diclofenac, est peut être due à l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou à la diminution des taux d'enzymes antioxydants. L'ulcération induite par les AINS provoque l'accumulation des radicaux libres d'oxygène, qui jouent un rôle crucial dans la physiopathologie de l'ulcération gastrique (Szelenyi et *al*., 1988). Les radicaux libres oxygénés provoquent une peroxydation lipidique qui augumente la fluidité membranaire et l'entrée du Ca^{2+} dans les cellules épithéliales ce qui entraîne une diminution de l'intégrité membranaire et ainsi des ulcères gastriques (Bandyopadhyay et *al*., 1999).

Il a été constaté que les radicaux libres sont impliqués dans le mécanisme d'ulcération aiguë et chronique (Loguercio et *al*., 1993). Une augmentation des niveaux de produits de peroxydation lipidique pourrait accélérer le processus ulcératif chez les rats traités par le DCF. Alors que l'inhibition de la peroxydation lipidique lors de l'administration de l'EMEP, d'acide gallique et de l'oméprazole peut empêcher les lésions ulcéreuses induites par le DCF. Cet effet protecteur est peut-être dû à la captation des molécules du MDA par les principes actifs ou bien à l'inhibition des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (Kebsa, 2006). Ces Résultats sont en accord avec plusieurs auteurs (Chidambara et *al*., 2002; Lai et *al*., 2009).

3.3.3. Activité enzymatique de la superoxyde dismutase SOD

Le superoxyde dismutase (SOD) représente l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Ces métalloprotéines assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Garre et *al*., 2007).

La figure 26 représente les valeurs de l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu gastrique, après le traitement par le diclofénac seul (150mg/kg) et en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100 mg/kg) ou l'oméprazole (20mg/kg) pendant 3 jours.

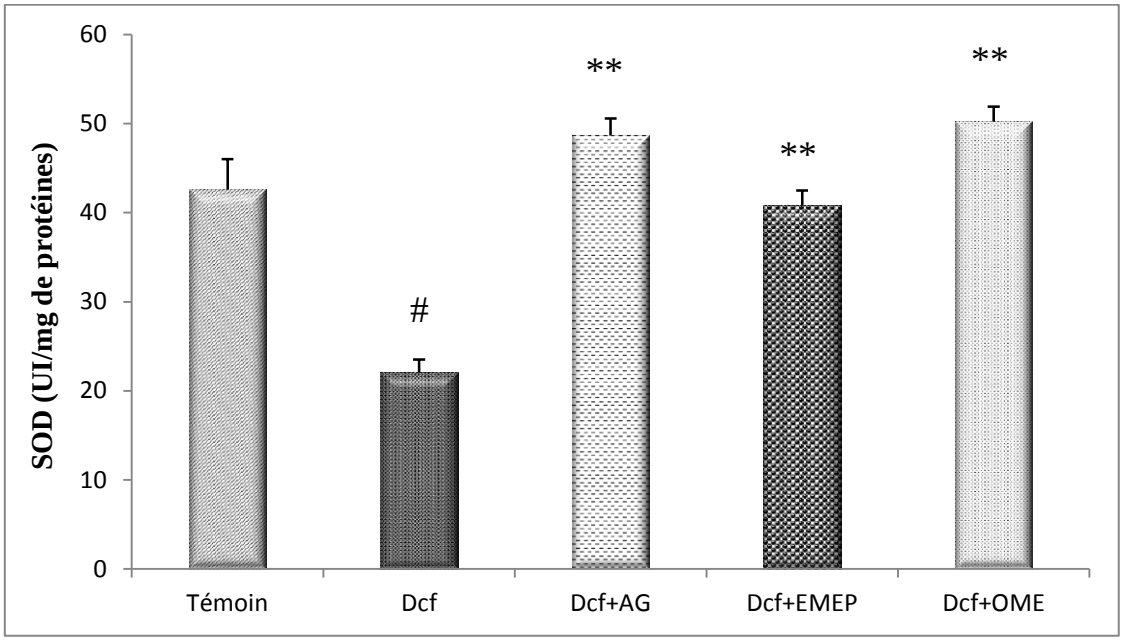


Figure 26. *Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu gastrique, après le traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg), et en cas de prétraitement par l'EMEP (100 mg/kg), l'AG (100mg/kg) et l'oméprazole (20mg/kg) pendant 3 jours.*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin $^{\#}$ *P ≤ 0,05 désigne un effet significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac :* ***P≤ 0,01 désigne un effet très significatif.*

Une réduction significative (p <0.05) de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique gastrique a été enregistrée chez les rats traités par le diclofénac, elle atteint 22,05 ± 1,48 UI/mg de protéines contre 42,61 ± 3,38 UI/mg de protéines chez les rats témoins. Avec un pourcentage de réduction de 48,25 %. Cette réduction est peut être due à la destruction de cette enzyme suite au stress cellulaire induit par les métabolites toxiques du DCF ou encore suite à son oxydation par les ERO (Kebsa, 2006). Cependant, l'activité de la SOD a augmenté de façon très significative (*P≤ 0,01)* dans les groupes qui ont reçu 100 mg/kg de l'AG (48,66 ± 1,89 UI/mg de protéines), de l'EMEP (40,8 ± 1,69 UI/mg de protéines) et ceux recevant l'oméprazole à 20mg/kg (50,2 ± 1,69 UI/mg de protéines) par rapport au groupe traité par le DCF seul. Les pourcentages d'augmentation sont dans l'ordre de 54,68 %, 45,95 % et 56,076 % pour l'EMEP, l'acide gallique et l'oméprazole. Ceci prouve l'effet préventif de ces traitements contre la toxicité gastrique du DCF. Cette amélioration de l'activité enzymatique est peut être due à l'induction de l'expression génétique ou à l'activation de cette enzyme (Kebsa, 2006).

3.3.4. Activité enzymatique de la catalase

La catalase est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques (Niki *et al.,* 2007). Elle est localisée principalement dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (Lindau-Sehpard et Shaffer, 1993).

L'activité enzymatique de la catalase dans le tissu gastrique des rats traités par le diclofénac seul à (150mg/kg) et en cas de prétraitement par l'EMEP à (100mg/kg), l'acide gallique (AG) à (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) à (20mg/kg) pendant 4 jours sont représentés dans la figure 27 ci-dessous.

Dans cette étude, une réduction significative (p < 0,05) de l'activité de la CAT a été enregistrée chez des rats ayant reçu le DCF seul (0,15 ± 0,014 UI /g de protéines) par rapport au témoin (0,29 ± 0,007UI /g de protéines). La réduction de l'activité CAT reflète l'installation d'un stress oxydatif, et confirme les résultats obtenus par (Niki et *al.,* 2007). L'activité de la CAT dans les groupes prétraités avec l'AG (0,23 ± 0,056 UI /g de protéines), l'EMEP (0,27 ± 0,05UI /g de protéines) et avec l'oméprazole (0,24 ± 0,028UI /g de protéines) a été augmenté de façon significative (P ≤ 0,05) par rapport au groupe traité par le diclofénac seul (0,15 ± 0,014 UI /g de protéines).

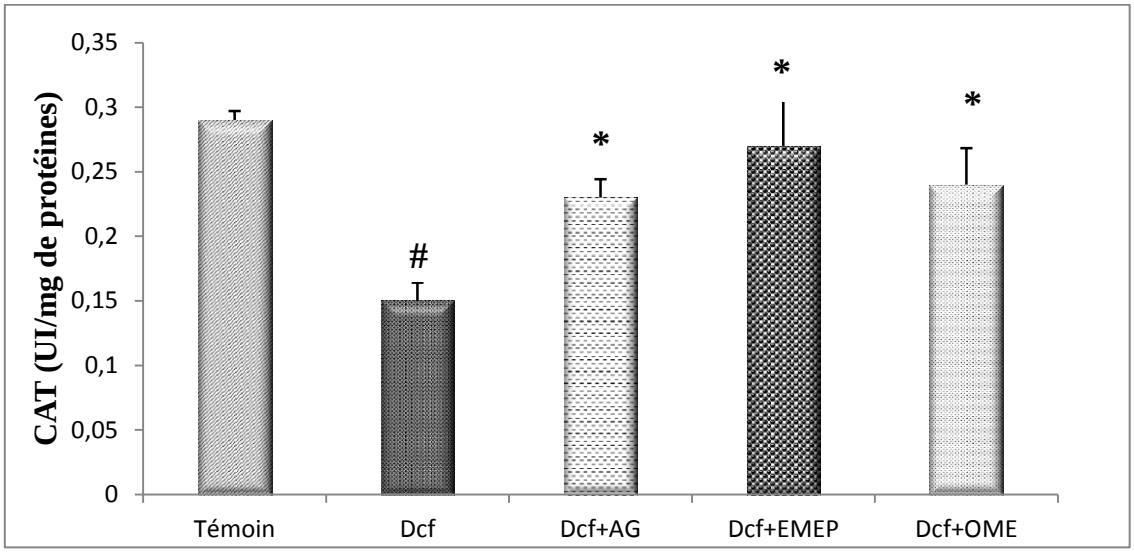


Figure 27. *Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) dans le tissu gastrique après traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg) pendant 3 jours.*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin : $^{\#}P \leq 0,05$ *désigne un effet significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac :* $*P \leq 0,05$ *désigne un effet significatif,* $^{NS}P > 0,05$ *désigne un effet non significatif.*

Le CAT peut protéger la muqueuse gastrique contre les radicaux libres en réduisant l'H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire (Panneerselvam et Arumugam, 2011). La SOD et la CAT constituent la première ligne de défense contre les ERO (Verma et Nair, 2001), la SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui, à son tour, est dismuté en eau et en oxygène moléculaire via la catalase (Tremellen, 2008). L'administration de diclofénac (150mg/kg) aux rats a entraîné une diminution de la concentration de la SOD et CAT; ces résultats sont similaires à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Devi et *al*., 2007; Saiah et *al*., 2017). Cette diminution pourrait être due à la destruction de ces enzymes suite au stress cellulaire induit par le diclofénac, ou encore suite à son inactivation par les ERO (Preetha et *al*. 2006).

Le prétraitement des rats par l'EMEP et l'acide gallique a augmenté l'activité enzymatique de la SOD par rapport aux rats qui reçoit le diclofénac. L'explication probable de cet effet est l'induction de l'expression des SOD et CAT, ou l'activation de ces enzymes ce qui prouve l'effet préventif de l'EMEP et de l'acide gallique. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Sen et *al*., (2013) qui ont montré une réduction significative de l'activité de la SOD et de la CAT chez les rats prétraité par l'acide gallique à la dose de 100mg/kg . Plusieurs études suggèrent que l'extrait de l'écorce de grenade renforce le système antioxydant par réduction de la production de ERO (Chidambara et *al*., 2002). L'EMEP présente un effet gastro-protecteur important contre les

dommages gastriques induits par le diclofénac, qui est probablement lié à leur teneur élevée en plyphénols et en tanins (Seeram et *al*., 2006), et à leur capacité à maintenir l'intégrité de la membrane cellulaire, à réduire la péroxydation des lipides et à conserver et/ou à activer les enzymes anti-oxydantes (SOD, CAT).

3.3.5. La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GSH-PX) ou GPx est une enzyme constituée de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium (Delattre et *al*., 2005). Le rôle principal de la GSH-PX consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultants de l'action des radicaux libres sur les acides gras polyinsaturés aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH) (Schrader et Fahimi, 2006; Valko et *al*., 2007). Dans les cellules de la muqueuse gastrique, la GPx joue un rôle fondamental dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des hydro-perxydes lipidique (Jeon et *al*., 2014) en utilisant le glutathion (GSH) comme donneur d'électron qui seras oxydé à son tour en glutathion oxydé (GSSG) (Pisoschi et Pop, 2015).

La figure 28 illustre les variations de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) après un traitement par le DCF seul (150 mg/kg), ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100 mg/kg), l'acide gallique (100 mg/kg) ou l'oméprazole (20 mg/kg) pendant 3 jours.

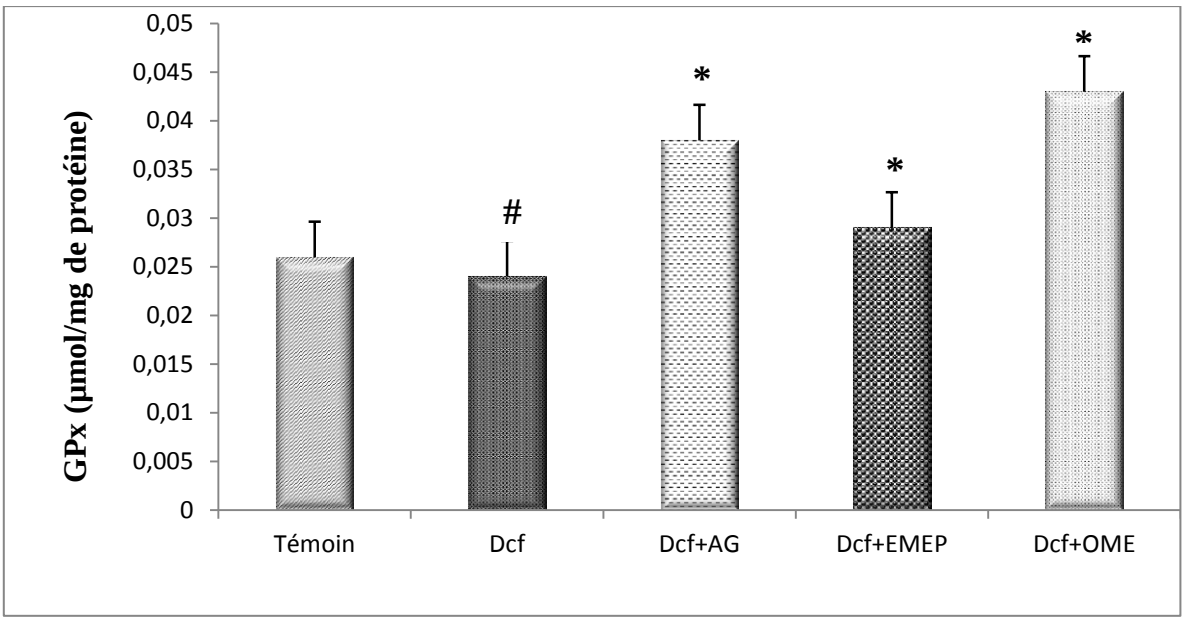


Figure 28. *Variation de l'activité enzymatique de la GPx dans le tissu gastrique après le traitement par le diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg) pendant 3 jours.*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin $^{\#}P \leq 0,05$ *désigne un effet significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac :* $^{*}P \leq 0,05$ *désigne un effet significatif.*

Une réduction significative (P≤0,05) de l'activité enzymatique de la GPx a été enregistrée chez les rats traités par le DCF seul (0,024 ± 0,0014 µmol GSH/mg de protéine) par apport aux rats témoins avec une activité de (0,026± 0,0028 µmol GSH/mg de protéine). Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats obtenus par Bhama et *al*., (2015) et Lekha et *al*., (2016) qui ont observé une réduction significative de l'activité GPx chez les rats traités par l'aspirine comme agent ulcérogène. Cependant, une augmentation significative (P≤0,05) a été enregistrée chez les rats prétraités par l'EMEP (0,029± 0,0035 µmol GSH/mg de protéine), avec l'acide gallique (0,038 ± 0,0028 µmol GSH/mg de protéine) et avec l'oméprazole (0,043± 0,0035 µmol GSH/mg de protéine). Ceci est peut être expliqué la capacité des polyphénols à améliorer les taux de GSH intracellulaire par l'induction de sa biosynthèse et sa régénération ou également par la capacité des polyphénols à piéger les radicaux libres (Lahouel et *al*., 2010). Les résultats de Sen et *al*., (2013) ont montré que l'acide gallique présente un effet stimulateur des mécanismes anti-oxydants et inhibiteur des mécanismes pro-oxydants dans le tissu gastrique.

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence l'implication de la GPx dans les voies de détoxification et de protection des cellules gastriques contre les effets délétères du stress oxydant induit par le diclofénac.

3.3.6. Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)

Les glutathion S-transférases représentent une importante famille d'isoenzymes réparties en huit classes. Les GST sont des enzymes solubles avec une masse moléculaire d'environ 25 kDa. Les fonctions biologiques remplies par les GST sont diverses. Les plus importantes sont la détoxication des xénobiotiques, la protection des cellules contre les métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules, et la catalyse la conjugaison de GSH avec de nombreux xénobiotiques et leurs métabolites réactifs (In-Sik Shin et *al*., 2013; Jeo et *al*., 2014).

La figure 29 ci-dessous représente les variations des taux de la GST cytosolique, les rats prétraités par le diclofénac seul ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique à (100mg/kg) ou l'oméprazole à (20mg/kg).

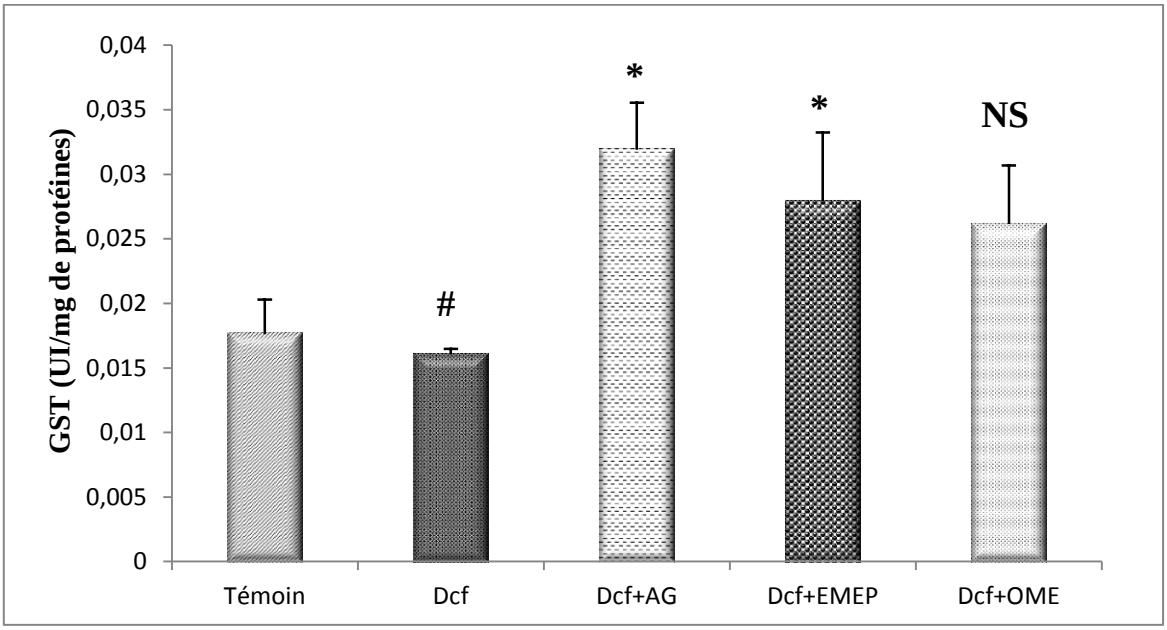


Figure 29. *Variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique gastrique après une dose de diclofénac absolu seul (150mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EMEP (100mg/kg), l'acide gallique (AG) (100mg/kg) ou par l'oméprazole (OME) (20mg/kg) pendant 3 jours.*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par le diclofénac et Témoin $^{\#}P \leq 0,05$ désigne un effet significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le diclofénac : $^{*}P \leq 0,05$ désigne un effet significatif.

A partir des résultats obtenus on a remarqué une diminution significative (P< 0.05) de l'activité de la GST chez les rats traités par le diclofénac seul (0,016 ± 0,00033µmol GSH/mg de protéine) en comparaison avec les rats témoins (0,017± 0,0025 µmol GSH/mg de protéine). Cette réduction est peut être due à la formation et à l'accumulation de ROS sous l'effet du diclofénac (Manal et *al*., 2016). Par contre une augmentation significative (P< 0.05) a été enregistrée chez les rats prétraités par l'EMEP, acide gallique ou l'oméprazole, ces activités sont dans l'ordre (0,027 ± 0,0035 ; 0,032 ± 0,0052 ; 0,02585 ± 0,0044 µmol GSH/mg de protéine).

L'augmentation de l'activité de la GST sous l'effet des différents traitements est surtout en cas de prétraitement par l'EMEP, est peut être due à l'induction directe de cet enzyme par les polyphénols.

3.4. Etude histologique microscopique

La figure 30 ci-dessous montre les résultats de l'étude histologique microscopique des tissus gastriques des rats traités par le diclofénac seul (150 mg/ml), en association avec l'EMEP (100 mg/kg), l'acide gallique (100 mg/kg) ou l'oméprazole (20 mg/kg).

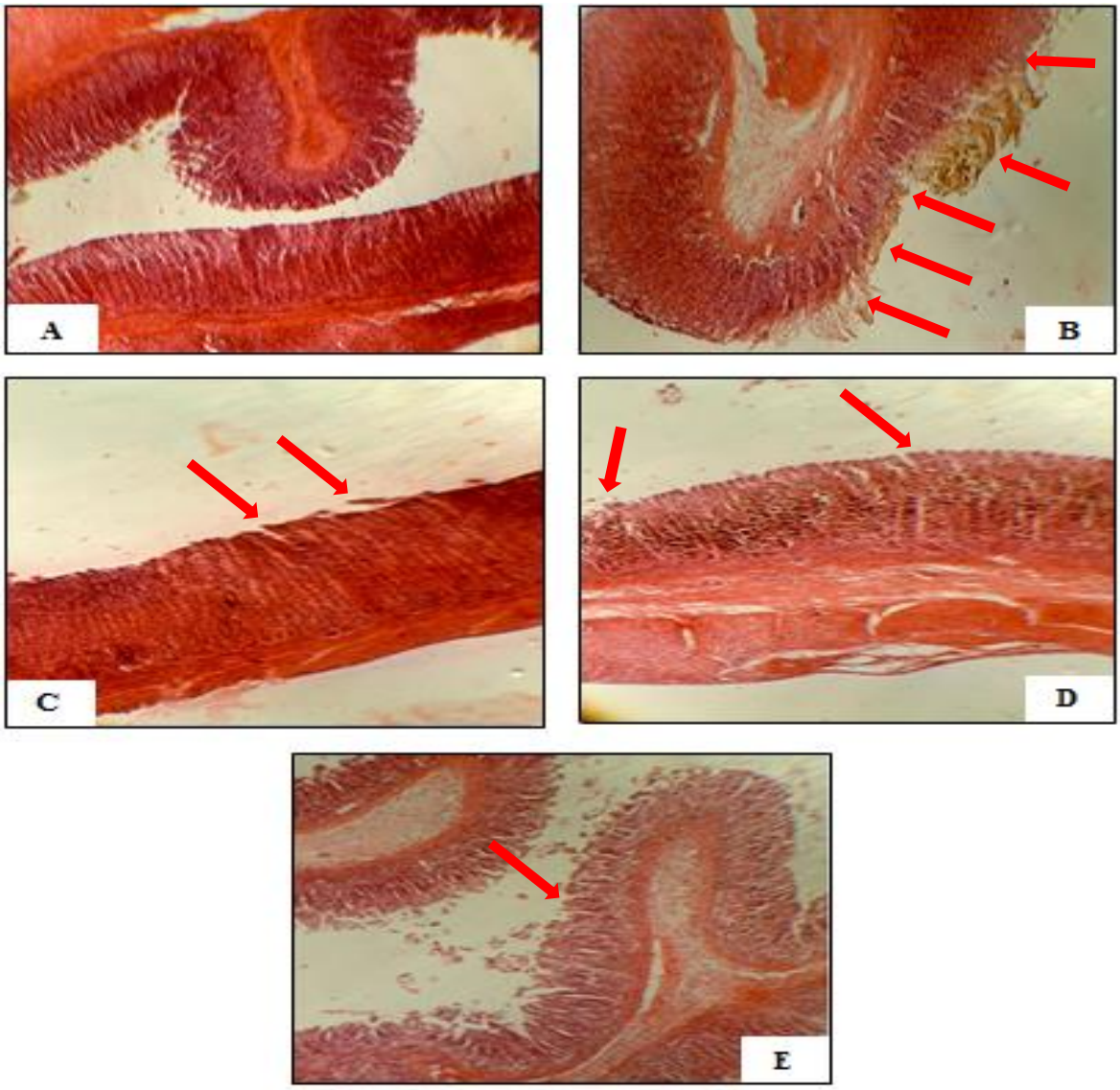


Figure 30. *Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine des tissus gastriques: (A) Témoin, (B) traité par le diclofénac seul, (C) prétraités par l'acide gallique, (D) prétraités par l'EMEP et (E) prétraités par l'oméprazol (×40).*

Chez le témoin, la muqueuse gastrique a révélé une architecture normale et saine (A). Cependant, l'examen histopathologique des estomacs du groupe traité par le diclofénac a montré des dommages gastriques étendus : réduction de l'épaisseur de la muqueuse gastrique associée à des nécroses (Flèche rouge) (B). Par contre, le prétraitement par l'EMEP à 100 mg/kg (D), l'acide gallique 100 mg/kg (C) ou l'oméprazole (E) a offert une atténuation considérable de ces anomalies avec conservation de l'épaisseur de la muqueuse gastrique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Saiah et *al*., 2017 qui ont montré que le diclofénac a provoqué de fortes dommages au niveau de la muqueuse gastrique avec augmentation des infiltrations des neutrophiles. De nombreux auteurs ont signalé que l'ulcère gastrique induit par les AINS s'accompagne d'une surproduction de ERO, ce qui peut entraîner une peroxydation lipidique qui constitue la cause majeure du dysfonctionnement cellulaire et des lésions observées (Bandyopadhyay et *al*., 1999).

4. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'EMEP et de l'acide gallique *in vivo*

L'expérience a été réalisée sur un modèle de l'œdème aiguë de la patte de rat induit par la carragénine. La carragénine est un mucopolysaccaride sulfaté provenant d'une Rhodophyceae (Dirosa, 1972). L'injection de cette substance provoque la libération des médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire. L'œdème induit par cet agent pathogène est considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et un paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés (Morris, 2003). Cette technique a été utilisée en raison de sa simplicité d'exécution et de sa rapidité d'induction (Chatter et *al*., 2013).

Nous avons testé sur ce modèle l'effet d'une dose unique de 200 mg/kg par voie orale de l'EMEP et de l'acide gallique pendent une heure de traitement. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de diclofénac (12mg/kg) et à ceux du contrôle ayant reçu la carragénine à 1%.

La figure 31 montre l'évolution de volume de l'œdème induit par la carragénine en absence et en présence de traitement par le diclofénac, l'EMEP et l'acide gallique.

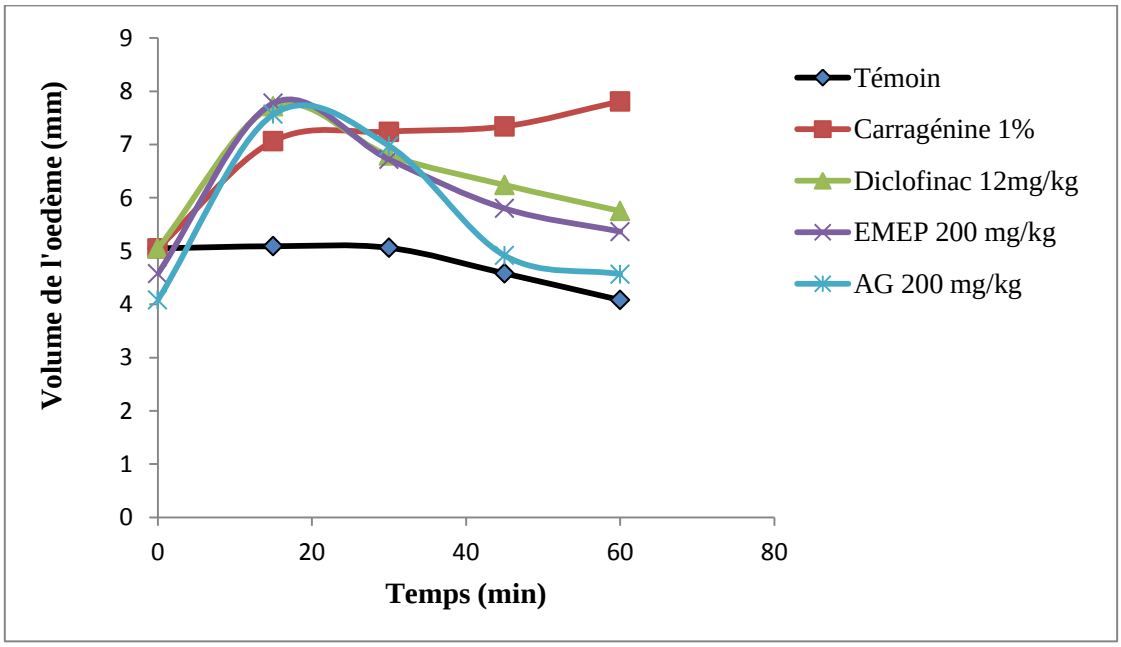


Figure 31. *Effet de diclofénac, de l'EMEP et de l'acide gallique sur le volume de l'œdème induit par la carragénine (mm).*

Nos résultats, montrent que l'injection de la carragénine à 1% entraine une augmentation très significative ($P \leq 0,01$) du volume de l'œdème chez tous les lots après 15 min d'injection, la circonférence de la patte passe de 7,065 ± 0,36 mm après 15min pour atteindre son maximum au bout d'une heure avec une valeur de 7,81 ± 0,94 mm chez les rats traité par la carragénine seule. Cela pourrait être dû à la réponse inflammatoire aiguë induite par la carragénine qui se caractérise

par l'infiltration de fluides tissulaires et de plasma entraînant la formation d'œdème et l'accumulation concomitante de leucocytes principalement les neutrophiles (Kumar et *al*., 2003).

L'administration de diclofénac comme anti-inflammatoire de référence à la dose de 12 mg/kg induit une diminution significative ($P \leq 0,05$) du diamètre de la patte du rat. L'épaisseur de l'œdème passe de 7,715 ±1,57 mm après 15 min à 5,75 ± 0,94 mm après une heure contre 4,77 ± 0,44 mm enregistrée chez le témoin. L'administration de l'acide gallique et de l'EMEP à la dose de 200mg/kg par voie orale a induit une diminution significative ($P \leq 0,05$) de l'épaisseur de l'œdème après une heure du traitement. Elle passe de 7, 775 ± 2,93 mm après 15 min à 5,365 ± 0,7 mm aprés1h pour l'EMEP, et de 7,565 ± 2,07mm après 15 min à 4,565 ± 0,166 mm après 1h pour l'acide gallique. Si on procède à une comparaison entre l'EMEP et l'acide gallique, on note que l'acide gallique possède l'effet anti-inflammatoire le plus efficace. L'EMEP donne un effet comparable ($p > 0.05$) à celui du Diclofénac alors que l'AG donne un effet meilleur.

La Figure 32 montre les pourcentages d'inhibition de l'inflammation induite par la carragénine à 1% après traitement par le diclofénac (12 mg/kg), l'acide gallique et l'EMEP à la dose de 200 mg/kg.

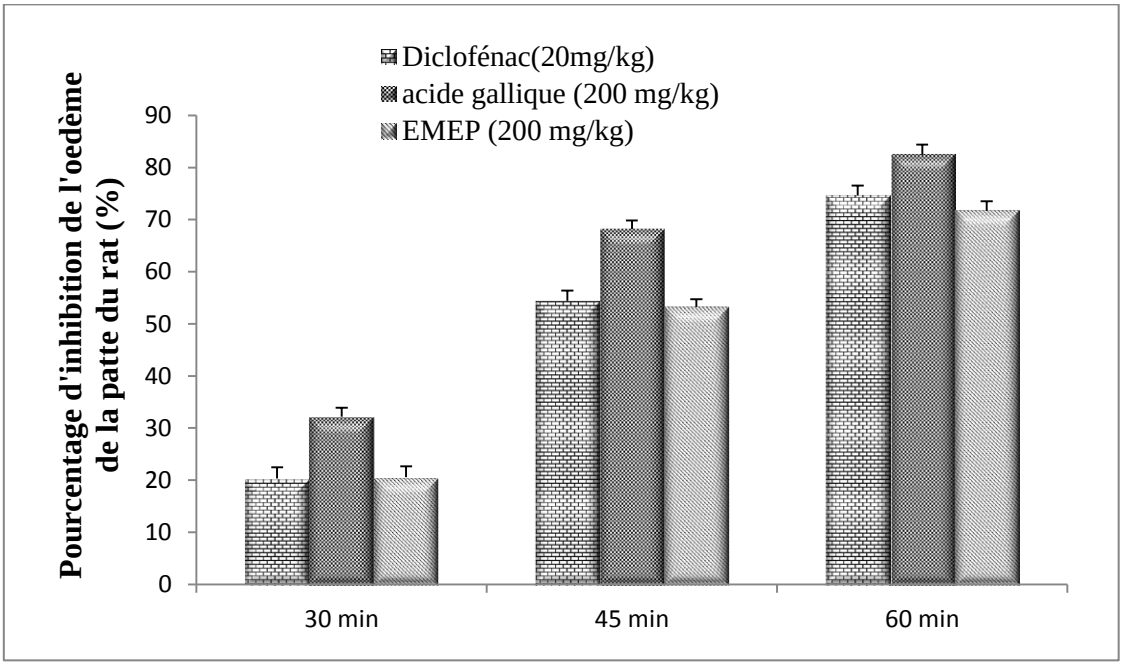


Figure 32. *Pourcentage d'inhibition de l'inflammation induite par la carragénine à 1% après traitement par le diclofénac (12 mg/kg), l'acide gallique ou l'EMEP à la dose de 200 mg/kg.*

Le développement de l'œdème de la patte du rat après l'injection de la carragénine a été décrit comme un événement biphasique. La phase initiale de l'œdème a été attribuée à la libération

d'histamine, de sérotonine et de substances semblables à la kinine, et la seconde a accéléré la phase de gonflement pour libérer les substance semblables aux prostaglandines (Wantana et *al*., 2009).

L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que l'administration par voie orale de diclofénac à la dose de (12 mg/kg) entraine une diminution significative de l'œdème ($P \leq 0,05$) à 30, 45 et 60 min de traitement avec un pourcentage d'inhibition de 20,31± 2,14 %, 54,4 ± 1,98 % et 74,63 ± 1,91% respectivement. Les AINS agissent en inhibant la cyclooxygénase (COX), qui inhibe la synthèse des prostaglandines, ce qui confère à cette classe de médicaments ses propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (Pereira-Leite et *al*., 2016). Les AINS peuvent être classés comme inhibiteurs non sélectifs (inhibant COX-1 et COX-2) ou comme inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Cependant, la plupart des médicaments anti-inflammatoires sont cliniquement efficaces au cours de la seconde phase de l'inflammation (Olajid et *al*., 2000; Mehmood et *al*., 2016). Le diclofénac, comme produit de référence, réduit l'inflammation par l'inhibition des cyclo-oxygénases enzymes responsables de la production des prostaglandines et du thromboxane (Bamane et *al*., 2012).

Les pourcentages d'inhibition de l'œdème chez les rats des lots traités par l'EMEP ou par l'acide gallique à la dose de (200 mg/kg) montrent que les deux traitements possèdent une activité anti-inflammatoire importante. Après 60 min, l'EMEP et l'acide gallique montrent respectivement un pourcentage d'inhibition de 71, 38 ± 1,84 % et 82,25 ± 2,01 %. De plus, l'acide gallique s'est révélé plus actif que l'EMEP et le diclofénac. Les acides phénoliques, comme l'acide gallique sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires (BenSaad et *al*., 2017). Les résultats de Sowndhar Rajan et *al*., (2018) suggèrent que l'acide gallique exerce un effet anti-inflammatoire en bloquant la libération d'histamine et l'expression des cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Les résultats de kim et *al*., (2006) prouvent que l'acide gallique inhibe les réactions allergiques inflammatoires dérivées des mastocytes en bloquant la libération d'histamine et l'expression des cytokines pro-inflammatoires. En effet, une autre étude réalisée sur la lignée cellulaire RAW264.7 a démontré que l'utilisation de l'acide gallique agit au niveau des médiateurs pro-inflammatoires en réduisant les taux des cytokines pro-inflammatoires comme : IL-1B, IL6, NO, NOS, COX-2 et TNF-alpha (Bensaad et *al*., 2017).

L'EMEP à la dose de 200mg /kg montre un pourcentage d'inhibition de 71, 38 ± 1,84 % similaire ($P > 0,05$) à celui de diclofénac à la dose de 12mg /kg (74,63 ± 1,91 %). Nos résultats sont cohérents avec ceux de Labib et El-Ahmady (2015), qui indiquent que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* (200 mg/kg) a diminué de façon similaire dans le groupe recevant le produit de référence Indométhacine (20 mg/kg) après 1 h. Après 2 heures, le groupe

traité par l'extrait méthanolique (200 mg/kg) a montré une diminution significative du volume de l'œdème de 53,3%, ce qui était considérablement plus élevé que celui résultant de l'administration de l'indomethacin (44, 86%). D'autre part, ces résultats sont en accord avec plusieurs études montrant que l'activité anti-inflammatoire de l'extrait peut s'expliquer en partie par la présence des composés polyphénoliques tels que les tanins hydrolysables et les flavonoïdes (Zarfeshany et *al*., 2014; Douaouri et Djebli, 2018). Ces derniers sont des composants bien connus des plantes anti-inflammatoires. Certains flavonoïdes ont montré une action inhibitrice dans divers modèles animaux d'inflammation (Kim et *al*., 2017). La majorité des tanins hydrolysables présents dans le grenade telle que : les gallotannines, l'acide ellagique et les gallagyl tannins, ont montré un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses humaines et modulent les voies de signalisation subcellulaires de l'inflammation en raison de leur forte activité anti-oxydante (Seeram et Nair, 2002). Leur action anti-inflammatoire serait due à un effet sur la migration leucocytaire (Biaye, 2002).

L'EMEP est très riche en polyphénols et en tanins. Il présente et l'acide gallique une activité anti-radicalaire très puissante *in vitro*, testés par le test DPPH° et le test FRAP. Ils présentent également une activité anti-inflammatoire puissante et un bon effet gastroptecteur et anti-ulcérogène contre l'ulcère gastrique induit pat le DCF, et ce via l'augmentation de la production de mucus, la réduction de l'acidité et l'amélioration de la balance antioxydant-prooxydant en faveur des antioxydants.

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. La majorité des médicaments actuels sont des copies concentrées de remèdes végétaux, notamment les polyphénols et les tanins qui sont les composés les plus intéressants et les plus étudiés de nos jours. Actuellement, un grand intérêt est porté à l'utilisation traditionnelle des écorces de *Punica granatum*, cette plante est bien connu par sa richesse en acides hydroxybenzoïques, connu sous le nom d'«acide gallique».

A l'issue de ce travail, visant à vérifier expérimentalement le bien-fondé de l'usage traditionnel de cette plante, et de l'acide gallique, un modèle d'ulcération induit par le diclofénac a été appliqué. De cette étude nous pouvons ressortir les points suivants:

- L'extraction des composés bioactifs des écorces de *Punica granatum* par macération a fourni un rendement de 40.48% de l'extrait brut (EMEP).

- L'évaluation quantitative des composés polyphénoliques a révélé la présence de quantités importantes de polyphénols et de tanins hydrolysables atteint 168.09 ± 8.063 mg EAG/g de MS et 102.4 ± 4.087mg EAT/g MS respectivement. La teneur en flavonoïdes est faible de l'ordre de 30.195 ± 3.091 mg EQ/g MS.

- Sur le volet chimique, l'analyse qualitative a été faite pour les extraits méthanolique et éthanolique de la plante par CG-MS. Cette dernière a révélé, d'une part que les extraits contiennent des flavonoides (Pinostrobinchalcone, Flemichapparine, …), des acides phénols (Acetylferulique, …), des mono-et di-terpènes (1-Nonadecene, 1-Tridecene, Phytol,…), des sesquiterpènes (squiterpenealcohol, (R)-Cuparene, Bergamotene,…), des acides gras insaturés et des esters d'acides gras.

- Le potentiel anti-radicalaire a été déterminé par la méthode de DPPH et FRAP, qui montrent que l'EMEP et l'AG présentent des propriétés anti-oxydantes concentration-dépendantes remarquables avec des IC50 de 58,16 et 62,34 µg/ml respectivement.

- L'étude macroscopique des estomacs a révélé, que l'EMEP et l'AG à la doses de 100 mg/kg, préviennent les lésions gastriques provoquées par le DCF et donnent le même effet que l'oméprazole avec des pourcentages d'inhibition des lésions égales à 73.08%, 73.39 % et 78,89% respectivement.

- En parallèle l'évaluation des paramètres gastriques a montré que l'EMEP et l'AG à la dose de 100 mg/kg ont amélioré la production du mucus et l'acidité, et le volume de suc gastrique.

- L'effet gastro-protecteur de l'acide gallique et de l'EMEP *in vivo* est due à l'amélioration de la balance antioxydant-prooxydant, par le renforcement des capacités antioxydantes enzymatiques (CAT, SOD, GPx et GST) et non enzymatiques (GSH) responsables de l'inhibition de la peroxydation lipidique et la réduction des dommages gastriques causés par le diclofénac.

- L'effet gastro-protecteur est dû également à l'effet anti-inflammatoire de l'EMEP et d'acide gallique confirmé sur le modèle de l'inflammation aigue induit par la carragénine.

- Sur le plan histologique, l'EMEP et l'AG à 100 mg/kg présentent un effet gastro-protecteur comparable à celui de l'oméprazole médicament de référence.

Globalement, la plante sélectionnée dans ce travail contient des molécules bioactives très intéressantes qui peuvent être purifiées et employées pour la prévention de l'ulcère gastrique et pour d'autres applications thérapeutiques.

Ce travail ne représente donc qu'une étude préliminaire qu'elle est certes prometteuse mais qui nécessite des études complémentaires afin de pouvoir élucider le mécanisme d'action exact de l'effet anti-ulcérogène et anti-inflammatoire de *Punica granatum* et de l'acide gallique et ce à travers :

- Détermination de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires par RT-PCR : cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL6, NO, NOS, COX-2 et TNF-alpha.
- Détermination des niveaux plasmatiques de la Gastrine, histamine et pepsine.
- La purification des principes actifs majoritaires de *Punica granatum* impliqués dans le pouvoir gastro-protecteur et anti-inflammatoire.

Références Bibliographiques

A

- **Abraham K., Gurtler R., Berg K., Heinemeyer G., Lampen A et Appel KE.** (2011). Toxicology and risk assessment of 5-hydroxymethylfurfural in food. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55:667–678.
- **Ader JL., Carre F., Xuan ATD., Duclos M., Kubis N., Mercier J., Mion F., Prefaut C et Roman S.** (2006). Physiologie. 2ème Edition. *Elsevier Masson*. Paris. p.247.
- **Agrawal AK., Rao CV., Sairam K., Joshi VK et Goel RK.** (2000). Effect of *Piper longum* Linn, *Zingiber officianalis* Linn and Ferula species on gastric ulceration and secretion in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 38(10): 994-8.
- **Ahad S., Tanveer S., Malik TA et Nawchoo IA.** (2018). Anticoccidial activity of fruit peel of *Punica granatum* L. *Microbial Pathogenesis*.116: 78-83.
- **Ajaikumar KB., Asheef M., Babu BH et Padikkala J.** (2005). The inhibition of astric mucosal injury by *Punica granatum* L (pomegranate) methanolic extract. *Journal Ethnopharmacol*. 4(96): 171-6.
- **Akomolafe SF., Akinyemi AJ et Anadozie SO.** (2014). Phenolic Acids (Gallic and Tannic Acids) Modulate Antioxidant Status and Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *International Scholarly Research Notices*. p. 1-4.
- **Arpino P.** (2015). Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse II. *ResearchGate*. p.1491 – 3.
- **Aruoma OI., Murcia A., Butler J et Halliwell B.** (1993). Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. p. 1880-1885.
- **Asnaashari M., Farhoosh R et Sharif A.** (2014). Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*. 159 : 439-444.
- **Asselah F.** (2013). Pathologie gastrique. In : Pathologie digestive. *Offices des publications universitaires* .Ben Aknoun-Alger. p .33.

B

- **Badhani B., Sharma N et Kakkar R.** (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *The Royal Society of Chemistry*. 5: 27540-27557.
- **Bado A et Sobhani I**. (2011). Physiologie de la sécrétion gastrique. *Elsevier Masson SAS - gastro-entérologie*. Paris. p.1-14.
- **Bafna PA et Balaraman R.** (2004). Anti-ulcer and antioxidant activity of DHC-1, a herbal formulation. *journal of ethnopharmacology*. 90:123-127.

- **Bagri P., Ali M., Aeri V., Sultana S and Bhowmik M.** (2010). Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Punica granatum* Linn. *International Journal of Drug Development & Research.* 2 (4): 698-702.
- **Balasundram N., Sundram K et Samman S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity Occurrence and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191–203.
- **Balian A.** (2011). Ulcére gastrique et duodénal. In : Hépato-gastro entérologie. 2ème Edition. Paris. *Elsevier Masson.*
- **Bamane FH., Jihan MB et Omayma ARM.** (2012). Antioxidant activities and flavonoid contents of selected plants belonging to family Loranthaceae. *African Journal of Biotechnology*. 11(78): 14380-14385.
- **Bandyopadhyay U., Das D., Bandyopadhyay D., Bhattacharjee M et Banerjee M.** (1999). Role of reactive oxygen species in mercaptomethylimidazole-induced gastric acid secretion and stress-induced gastric ulceration. *Current Science.* 76: 55–63.
- **Barros MP., Lemos M., Maistro EL., Leite MF., Sousa JP., Bastos JK et Andrade SF.** (2008). Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. *Journal of Ethnopharmacology.*120: 372-377.
- **Barry J., Marshall J et Warren R.** (2005). The bacterium Helicobacter pylori and its role in gastritis and peptic ulcer disease. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*. 29(9): 333-343.
- **Bazin T et Lamarque D.** (2018). La sécrétion acide : régulation, applications en clinique. actualités. *Hépato-Gastro & Oncologie Digestive*. 25(4): 342-52.
- **Beaugerie L et Sokol H**. (2014). Les fondamentaux de la pathologie digestive. Enseignement intégré-Appareil digestif. Collégiale des universitaires en hépato-gastro-entérologie. Estomac-duodénum. *Elsevier Masson*. p .18-32.
- **Bechkri D., Berrehal Z., Semra K., Bachari A., Kabouche Z et Kabouche.** (2017) Composition and biological activities of seeds oils of two Crataegus species growing in Algeria S. *Journal of Materials and Environmental Science.*8(5): 1526- 1531.
- **Belon JP et Lacour B.** (2015). Physiologie du système digestif. *Elsevier Masson*. p. 229-235.
- **BenSaad LA., Kim KH., Quah CC., Kim WR et 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: 47.
- **Bhama D., Sampathkumar P., Dheeba B et Sheikabdulla.** (2015). Gastroprotective effect of glycyrrhiz aglabara Linn on Aspirin Induced Ulcer in Albinos Rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review*. 34 (2) : 13-18.
- **Biaye M.** (2002). Action pharmacologique des tanins. Thèse de Pharmacie, Université Cheick Anta Diop de Dakar. Dakar. p. 95.

- **Bidri M Choay P.** (2016). Regain d'intérêt pour la grenade, un fruit majestueux aux multiples propriétés. *Lavoisier SAS.* p. 2-3.
- **Bienia A., Sodolski W et Luchowska E.** (2002). The effect of chronic alcohol abuse on gastric and duodenal mucosa. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Medical*. 57(2):570-82.
- **Boccellato F., Woelffling S., Matsushima A L., Sanchez G., Goosmann C., Schmid M ., Berger H., Morey P., Denecke C., Ordemann J et Meye T.** (2018). Polarised epithelial monolayers of the gastric mucosa reveal insights into mucosal homeostasis and defence against infection. *British Society of Gastroenterology*. p.1-14.
- **Bonnaille C., Salacs M., Vassiliova E et Saykova I.** (2012). Etude de l'extraction des composes phénoliques à partir des pellicules d'arachide (Arachis hypogaea L). *Revue de génie industriel*. 7 : 35-45.
- **Borde VU., Pangrikar PP et Tekale SU.** (2011). Acide gallique dans les herbes et formulations ayurvédiques. *Recent research in science and technology*. p. 51-4.
- **Borneley S et Peyrat-Maillard M.** (2000). Antioxidant activity of malt root letextracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2785-2792.
- **Boron W et Boulpaep E. (2009)**. Medical Physiology. 2ème Edition. *Elsevier Masson*. p.895
- **Bouarioua N., Merrouche M., Pospai D et Mignon M**. (2007). Physiopathologie de la maladie ulcéreuse gastroduodénale à l'ère d'Helicobacter pylori. *Elsevier Masson-Gastro-entérologie*. 2(4):1-12.
- **Bougandoura N et Bendimerad N.** (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.). Nature & Technologie (9) :14-19.
- **Boukhobza F et Goetz P.** (2014). Phytothérapie en odontologie. *Edition CDP*.
- **Bourin M., Lièvere M et Allain H.** (1993). Médicaments de l'appareil digestif. In : Cours de pharmacologie. 3ème Edition. *Ellipes*. Paris. p. 225-229.
- **Bouroshaki MT., Sadeghnia HR., Banihasan M and Yavari S.** (2010). Protective effect of pomegranate seed oil on hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity in rat kidneys. *Renal Failure.* 32: 612-617.
- **Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*.72: 248-254
- **Brooks D et Watson GL.** (1997). Omeprazole in a dog with gastronime. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* p. 379-381.

ت

- **Calin SA et Carboneli BA.** (2005). La grenade cultivée en Espagne punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum et université Miguel Hermandez (EDS). *Murcia Espagne*. p.77.

- **Cambay Z., Baydas G., Tuzcu M and Bal R.** (2011). Pomegranate (*Punica granatum* L.,) flower Improves learning and memory performances impaired by diabetes mellitus in rats. *Acta Physiologica Hungarica.* 98: 409-420.
- **Capuano E et Fogliano V.** (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (hmf) : A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT- Food Science and Technology*. 44 : 793–810.
- **Carolyn J., Hildreth MD., Cassio Lynm MA., Richard M. ET Glass MD**. (2008). Helicobacter pylori. *The Journal of the American Medical Association*. p11.
- **Cartron E., Fouret G., Carbonneau MA., Lauret C., Michel F., Monnier L., Descomps B et Leger CL.** (2003). Red-winebeneficiallong-termeffect on lipids but not on antioxidantcharacteristics in plasma in a studycomparingthree types of wine-description of two O-methylatedderivativesfor gallicacid in humans. *Free Radical Research.* 37: 1021–1035
- **Chatter Riahi SR., Tarhouni et Kharrat R.** (2013). Criblage de l'effet anti□inflammatoire et analgesique des algues marines de la mer mediterranee. *Les Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*. p.19-28.
- **Chatterjee A., Chatterjee S., Biswas A., Bhattacharya S., Chattopadhyay S et Sandip K.** (2012). Bandyopadhyay. Gallic Acid Enriched Fraction of Phyllanthus emblica Potentiates Indomethacin-Induced Gastric Ulcer Healing via e-NOS-Dependent Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative*. p.1-13.
- **Chevallier JM.** (1998). Tronc. In : Anatomie. Tome 1. *Médecine sciences publications*. p .170 - 172.
- **Chevrel JP**. (1991). Introduction à l'étude de l'anatomie. Abrège d'anatomie générale. *Elsevier Masson*. Paris. p. 201.
- **Chew YL., Goh JK et Lim YY.** (2009). Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from leguminosae family in Peninsular Malaysia. Food Chemistry.116 :13-18
- **Chidambara MKN., Singh RP et Jayaprakasha GK.** (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50(1):81-6.
- **Claiborne A.** (1985). Catalase activity. Dans : CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Édition *Greenwald R.A.* p. 283-284.
- **Cnubben NHP., Rietjens IMCM., Wortelboer H., Zanden JV., Bladeren PJV.** (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 10 :141–152.
- **Cohen Y et Jacquot C.** (2001). abréges pharmacologie. 5ème Edition. p. 326-327.

D

- **Dahlawi H., Jordan-Mahy N., Clench MR and Le Maitre CL.** (2012). Bioactive action of pomegranate fruit extracts on leukemia cell lines *in vitro* hold promise for new therapeutic agents for leukemia. *Nutrition and Cancer*. 64:100-110.
- **Davies NM et Anderson KE.** (1997). Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clinical Pharmacokinetics*. p. 184–213.
- **Delattre J., Beaudeux JL et Rousselot B.** (2005). Radicaux libres et stress oxydant:aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales.* Paris. 14 : 93-94. extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(8): 674-679.
- **Devi RS., Narayan S., Vani G et Devi CSS.** (2007). Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chemico-Biological Interactions*.167:71–83.
- **Dewanto V., Wu X., Adomk KK et Liu RH. (**2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 : 3010-3014.
- **Dewick PM et Haslam E.** (1969). Phenol biosynthesis in higher plants Gallic acid. *The Biochemical Journal*. 113: 537–542.
- **Dirosa M.** (1972). Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.24: 89-102.
- **Douaouri NEH et Djebli N**. (2018). In vivo anti-inflammatory activity and chemical composition of Algerian pomegranate (*Punica granatum* L.). *International Journal of Biosciences*. 12 (2) : 76-90.
- **Doubek J., Svoboda P., Lojek A., Kantorova I., Ctz M., Cernal E.** (1996). Reactive oxygen species in the pathogenesis of stress-induced gastric ulceration in rats and protective effect of omeprazole. *Acta Veterinaria Brunensis.* 65(3): 201-207.
- **Drake RL., Vogl W et Mitchel M.** (2012). Gray's Anatomie pour les étudiants. *Elsevier Masson*. p. 298-299.

E

- **Elain N et Marieb.** (2008). Anatomie et la physiologie du système digestif. In : Biologie humaine. 2ème Edition. *Éditions du Renouveau pédagogique* .France. p. 513.
- **Elfalleh W., Hannachi H., Tlili N., Yahia Y., Nasri N et Ferchichi A.** (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research.*6: 32.
- **Ellman GL.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 82: 70-77.

- **El-Missiry MA., EL-Sayed IH et Othman AI.** (2001). Protection by metal complexes with SOD mimetic activity agaist oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats. *Annals of Clinical Biochemistry*. 38 : 694-700.
- **El-Sherbini GM., Ibrahim KM., El Sherbiny ET., Abdel-Hady NM et Morsy TA.** (2010). Efficacy of *Punica granatum* extract on *in-vitro* and *in-vivo* control of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 40: 229-244.

F

- **Farhoosha R et Nyström L.** (2018). Antioxidant potency of gallic acid, methyl gallate and their combinations insunflower oil triacylglycerols at high temperature. *Food Chemistry*. 244 : 29-35.
- **Farias JHC., Reis AS., Araujo MAR et Araujo MJMA.** (2014). Effects of stingless bee propolis on experimental asthma. *Evidence- Based Complementary Alternative Medicine*. p. 2-3.
- **Faried A., Kurnia D., Faried LS., Usman N., Miyazaki T et Kato H. (**2007). Effets anticancéreux de l'acide gallique isolé de la phytothérapie indonésienne, Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl, sur les lignées cellulaires cancéreuses humaines. *International Journal of Oncology*. p. 605-13.
- **Firuzi O., Mladenka P., Petrucci, R., Marrosu G et Saso L.** (2004). Hypochlorite scavengingactivity of flavonoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.56: 801–807.
- **Flohé L et Gűnzler WA.** (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*.105: 114-121.
- **Fokou N.** (2011). Effets antiulcérogeniques de l'extrait aqueux des écorces *d'Anthocleista shweinfurthii* (Logagniaceae) sur les ulcères gastriques aigus induits chez les rats. Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de l'Enseignement Secondaire grade II.
- **Foss SR., Nakamura CV., Nakamura TU., Cortez DAG., Endo EH et Dias Filho BP.** (2014). Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.*13: 32.
- **Fowler PD., Shadforth MF., Crook PR et John VA**. (1983). Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its major hydroxylated metabolites during long-term treatment of rheumatoid arthritis. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 25(3): 389–394.
- **Francoeur C., Tremblay-Coutu E., Desroches J., Poitras P., Beaulieu P et Lambert C.** (2010). Pharmacologie en gastroentérologie. In : Précis de pharmacologie du fondamental à la clinique. *Québec* : Les Presses de l'Université de Montréal .p. 483-495.
- **Fukumoto LR et Mazza G.** (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 3597-3604.

G

- **Galato D., Ckless K., Susin MF., Giacomelli C., Ribeiro-do-Valle RM et Spinelli A.** (2001). Antioxidant capacity of phenolic and related compounds : correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. *Redox Report*. 6: 243–250.
- **Garre C., Ceballos-Picot I., Germain G et Al-Gubory KH.** (2007). Oxidative strss inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death *in vivo*. *Free Radical Research*. 41: 251-259.
- **Gil M., Tomàs-Barberàn F., Hess-Pierce P., Holcroft DM et Kader AA.** (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 480: 4581−4589.
- **Goswami KS., Rand AA ., Wan D., Yang J ., Inceoglu B., Thomas M., Morisseau C., Yang GY et Hammock BD.** (2017). Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase or genetic deletion reduces diclofenac-induced gastric ulcers. *Life Sciences*. 180: 114-122.
- **Grahama DY et Miftahussurur M.** (2018). *Helicobacter pylori* urease for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A mini review. *Journal of Advanced Research*. p. 1-7.
- **Grasso GM., Ripabelli G., Sammarco ML., Ruberto A et Iannitto G.** (1996). Prevalence of *Helicobacter* like organisms in porcine gastric mucosa: a study of swine slaughtered in Italy. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious*.7(5): 201-205.

H

- **Habig WH., Pabst M et Jacobi WB.** (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249 :7130 -7139.
- **Haenen GR., Paquay JB., Korthouwer RE et Bast A.** (1997). Peroxynitritescavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 236: 591–593.
- **Haidari M., Ali M., Casscells SW and Madjid M.** (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomed.*16: 1127-1136.
- **Hanato T., Kagawa H., Yasuhara T et Okuda T.** (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effect Chem. *Pharmaceutical Bulletin.* 36: 1090-1097.
- **Hardman JG et limbird lE.** (1998). Les Bases Pharmacologiques et l'Utilisation des Médicaments. In : Les autacoïdes dérivés des lipides membranaires. 9ème Edition. London. p. 607-622.

- **Hebi M et Eddouks M.** (2016). Evaluationde l'activité anti-oxydante de Stevia rebaudiana. *Phytothérapie*. 14: 17-22.
- **Heim EK., Tagliaferro AR et Bobilya DJ.** (2002). Flavonoïds antioxydants : chemistry ; metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry*. 13 : 572-584.
- **Hsu CL et Yen GC.** (2007). Effet de l'acide gallique sur la dyslipidémie, l'hépatostéatose et le stress oxydatif induits par l'alimentation riche en graisses chez le rat. *British Journal of Nutrition*. p. 727-35.

I

- **In-Sik Shin IS., Lee MY., Lim HS., Seo CS., Ha HK et Shin HK.** (2013). Gastroprotective Eeffects of leejung-Tang, an Oriental Traditional Herbal Formula, On Ethanol-Induced Acute Gastric Injury in Rats. *African Journal of Traditional Complementaty and Alternative Medicines.* 10(2): 324-330.
- **Ioku K., Tsushida T., Takei Y., Nakatani N et Terao J.** (1995). Antioxidativeactivity of quercetin and quercetinmonoglucosides in solution and phospholipidbilayers. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1234: 99–104.
- **lto B.** (1981). Functional gastric morphology. In: Johnson *LR*. Physiology of the Castro intestinal Tract. *Raven Press*. New York. p. 517-50.

J

- **Jacinto AMT.** (2018). Review of the Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Properties of *Punica granatum L*., (Lythraceae) Plant. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2(3): 71-83.
- **Jainu M et Devi CS.** (2006). Antiulcerogenic and ulcer healing effects of Solanum nigrum (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. *Journal of Ethnopharmacology*. 104(1-2): 156-63.
- **Janzowski C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J et Eisenbrand G.** (2000). 5-hydroxymethylfurfural: Assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*. 38:801–809.
- **Jeon WY., Shin HK et Lee MY.** (2004). Gastroprotective effect of the traditional herbal medicine, Sipjeondaebo-tang water extract, against mucosal injury. *Complementary and Alternative Medicine.*14: 373.

- **Jolliet P., Fontaine M et Herlin *B.*** (2006). Nouveaux cahiers de l'infirmière pharmacologie et soins infirmiers ,2ème Editions. *Elsevier Masson SAS*. p. 185-187.
- **Jurenka JS.** (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Alternative Medicine Review*. 13(2): 128-44.

K

- **Kambourakis S., Draths KM et Frost JW.** (2000). Synthesis of Gallic Acid and Pyrogallol from Glucose: Replacing Natural Product Isolation with Microbial Catalysis. *Journal of the American Chemical Society*. 122: 9042–9043.
- **Kangwan N., Park GM., Kim EH et Hahm KB.** (2014). Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 5: 40-7.
- **Kang DG., Yun CK et Lee HS.** (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethno pharmacology*. 87: 231-23.
- **Kanoun K.., Abbouni, B., Gabbés S., Dellani S et Zizi N.** (2014). *In-vitro* Antibacterial Activity of Algerian Pomegranate (*Punica granatum linn*) Peels on Some Antibiotic Resistant Gram-Negative and Positive Bacterial Strains. ddle-East. *Journal of Scientific Research.* 21 (9): 1579-1589.
- **Kato N., Shiroya M., Yoshida S et Hasegawa M.** (1968). Biosynthesis of Gallique Acid by a Homogenate of the Leaves of Pelargonium inquinans. *The Botanical Magazine Tokyo*. 81: 506–507.
- **Katzung BG.** (1998). Pharmacologie fondamentale clinique. 7ème Edition .p. 599-619.
- **Kaur G., Jabbar Z., Athar M and Alam MS.** (2006). *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 44: 984-993.
- **Kaur M., Velmurugan B., Rajamanickam S., Agarwal R et Agarwal C.** (2009). Gallic Acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharmaceutical Research*. 26(9): 2133–2140.
- **Kebsa W.** (2006). Effet de la propolis Algérienne sur le stress oxydatif mitochondrial. Thèse de magister. Mohamed Sedik Ben Yahia-Jijel. p.128-132.
- **Keith lM et Arthur FD.** (2006). Anatomie médicale: Aspects fondamentaux et applications cliniques. *Boeck.* Paris. p. 134.
- **Keith lM et Arthur FD.** (2006). Anatomie médicale: Aspects fondamentaux et applications cliniques. *Boeck.* Paris. p.134.

- **Kim HP., Lim H et Kwon YS.** (2017). Therapeutic potential of medicinal plants and their constituents on lung inflammatory disorders. *Biomolecules and Therapeutics*. 25(2): 91–104.
- **Kim SH., Jun CD., Suk K., Choi BJ., Lim H., Park S et Shin TY.** (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological Sciences*. 91(1): 123-131.
- **Kirkiacharion S.** (2010). Guide de chimie medicinal et médicaments. *Lavoisier*. Paris. p.83.
- **Kobayashi H., Oikawa S., Hirakawa K et Kawanishi S.** (2004). Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutation Research*. 558: 111-120.
- **Kobayashi T., Ohta Y., Yoshino J et Nakazawa S.** (2001). Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neurophil infiltration and lipid peroxydation in ulcerated gastric tissues. *Phrmacological Rechearch*. 43(1): 23-30.
- **Koyama S., Cobb LJ., Mehta HH., Seeram NP., Heber D., Pantuck AJ et Cohen P.** (2010). Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. *Growth Hormone & IGF Research*. 20: 55-62.
- **Kuipers E et Blaser M.** (2013). Ulcères gastroduodénaux. In: Goldman's Cecil Medicine maladies gastro-intestinales. 24ème Edition. *Elsevier Masson*. p. 224.
- **Kulkarni JM et Swamy AV**. (2015). Cardioprotective effect of gallic acid against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian Journal of Health Sciences and Biomedical Research.* 8(1) : 28-35.
- **Kumar S., Boehm J et Lee JC.** (2003). MAP kinases: molécules de signalisation clés en tant que cibles thérapeutiques pour les maladies inflammatoires. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2: 717-726.

$\mathcal{L}$

- **Labib RM et El-Ahmady SH.** (2015). Antinociceptive, anti-gastric ulcerogenic and anti-inflammatory activities of standardized Egyptian pomegranate peel extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(1): 48–51.
- **Lacombe VA., Viatchenko-Karpinski S., Terentyev D., Sridhar A., Emani S., Bonagura JD., Feldman DS., Györke S et Carnes CA.** (2007). Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 293(5):1787-97.
- **Lahouel M., Boutabet K., Kebsa W et Alyane M.** (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4(10): 712-720.

- **Lai S., Zhou Q., Zhang Y., Shang J et Yu T.** (2009). Effects of pomegranate tannins on experimental gastric damages. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* . 34: 1290-1294.
- **Lakshmi V., Ameta K ., Mishra V, Srivastava A., Agarwal SK., Palit G et Mahdi AA.** (2013). Gastroprotective effect of ethanolic extract of Parmeliaperlata in rats. *The journal of phytopharmacology*. 2(6):19-25
- **Lansky EP et Newman RA.** (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal Ethnopharmacol*. 109: 177-206.
- **Larrosa M., González-Sarrías A., Yáñez-Gascón MJ., Selma MV., Azorín-Ortuño M., Toti S., Tomás-Barberán F., Dolara P et Espín JC.** (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 21(8): 717–725.
- **Larrosa M., Tomás-Barberán FA et Espín JC.** (2006). The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.17: 611-625.
- **Laurent B et Sokol H.** (2014). Les fondamentaux de la pathologie digestive. Histologie digestive. *Elsevier Masson.* p.659.
- **Lechon MG., Ponsoda X., Connor E., Donato T., Jover R et Castell J.** (2003). Diclofenacinducesapoptosis in hepatocytes. *Toxicology in Vitro*. 17: 675-680.
- **Lee CJ., Chen LG., Liang WL et Wanga CC.** (2010). Anti-inflammatory effects of *Punica granatum Linne* in vitro and in vivo. *Food Chemistry*. 118: 315–322.
- **Lefebvre Y.** (1975). Les prostaglandines. *Canadian Family Physician*. 21(8): 103-105.
- **Lefrancois T et Tiret L.** (2000). Physiologie de la digestion. 2ème Editions. *Polycopié*. Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de physiologie. p. 69.
- **Lehtinen P et Laakso S.** (1998). Effect of extraction conditions on the recovery andpotency of antioxidants in O at fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4842– 4845.
- **Lekha S., Bhatia A et Chakrabarti A.** (2016). Gastroprotective effect of bezafibrate, a peroxisome proliferator activated receptor a agonist and its mechanism in a rat model of aspirin-induced gastric ulcer. *Advances in Digestive Medcine*. 3: 101-110.
- **Lesur G., Artru P et Mitry E.** (2000). Hémorragies digestives ulcéreuses : histoire naturelle et place de l'hémostase endoscopique. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. p. 345.
- **Li MM., Wu LY., Zhao T., Xiong L., Huang X., Liu ZH., Fan XL., Xiao CR., Gao Y et Ma YB.** (2011). The protective role of 5-hmf against hypoxic injury. *Cell Stress Chaperones*.16:267–273.
- **Li W., Qu XN., Han Y., Zheng SW., Jia Wang J et Wang YP**. (2015). Ameliorative Effects of 5-Hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) from *Schisandra chinensis* on Alcoholic Liver Oxidative Injury in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*.16(2): 2446–2457.

- **Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J et Cheng S.** (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparisonwith pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*. 96: 254-260.
- **Lindau-Sehpard B et Shaffer J.** (1993). Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxiadative damage. *Free Radical Biology & Medicine*.8 :15 – 581.
- **Loguercio C., Taranto D., Beneduce F., Balanco CV., Vincentis A., Nardi G et Romano M.** (1993). Glutathione prevents ethanol-induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compound in humans. *Gut*. 34 :161–165.
- **Loygue J., Malafosse M et Derieux J.** (1982). Pathologie chirurgicale, chirurgie viscérale nouvelle édition augmentée. *Foucher* .p. 201.

M

- **Madlener S., Illmer C., Horvath Z., Saiko P., Losert A et Herbacek I.** (2007). L'acide gallique inhibe la ribonucléotide réductase et les cyclooxygénases dans les cellules leucémiques promyélocytaires humaines HL-60. *Cancer Letters*. p. 156-62.
- **Madrigal-Carballo S., Rodriguez G., Krueger C., Dre- her M et Reed J**. (2009). "Pomegranate (*Punica granatum*) Sup-plements: Authenticity, Antioxidant and Polyphenols Com- position. *Journal of Functional Foods*. 1(3): 324-329.
- **Main IHM et Whittle BJR.** (1975). Investigation of the vasodilator and antisecretory role of prostaglandins in the rat gastric mucosa by use of non-steroidal antiinflammatory drugs. *British Journal of Pharmacology*. 53: 217-224.
- **Manal M., Chandrasekar MJN., Gomathi priya J et Nanjan MJ.** (2016). Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorganic chemistry*. 67: 18-42.
- **Marieb E et Hoehn K.** (2014). Anatomie et physiologie humaines. 9ème Edition .*Pearson Education*. France. p. 1504.
- **Marieb EN et Hoehen K.** (2010). Le système digestif. In : Anatomie et physiologie humaine. 8ème Edition. *Pearson*. Canada. p. 1003-1009.
- **Marieb EN.** (2000). Biologie humaine anatomie et physiologie. 6ème Edition. *Boek*. Bruxelle. p. 413.
- **Marieb N.** (1999).Anatomie et physiologie humaine. *Boeck*. p.1126.
- **Marklund S et Marklund G.** (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47: 469-474.

- **Marxen K., Vanselow KH., Lippermeir S., Hintze R., Ruser A et Hansen UP**. (2007). Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*. 7: 2080–95.
- **Medan J.** (2004).Dictionnaire vidal. 8éme Edition. Paris. p. 1928-1929.
- **Mehmood A., Hamid I., Sharif A., Akhtar MF., Akhtar B., Saleem A., Iqbal J., Shabbir M et Ali S.** (2016). Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of aqueous and ethanolic extracts of seeds of *Buchanania Lanzan* Spreng, in animal models. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 73: 1601-1608.
- **Metowogo K., Eklu-Gadegbeku K., Agbonon A., Kodjo AA et Gbeassor M.** (2009). Gastroprotective Effect of Hydroalcoholic Extract of Aloe buettneri. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 10(1): 69-74.
- **Mezdour H., Hanfer M., Menad A et Ameddah S.** (2017). Rôle du stress oxydant dans l'apparition des lésions muqueuses gastriques. *Batna Journal of Medical Sciences évolue*. 4: 145-148.
- **Milan H.** (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : études et applications. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur. Spécialité pharmacologie. p. 13-3.
- **Moghaddam G., Sharifzadeh M., Hassanzadeh G., Khanavi M et Hajimahmoodi M.** (2013). Anti-Ulcerogenic Activity of the Pomegranate Peel (*Punica granatum*) Methanol Extract. *Food and Nutrition Sciences.* 4: 43-48.
- **Mohan-Das N., Sivakarama S., Karuppussamy S., Mohan VR et Parthipan B**. (2014).GC - MS analysis of leaf and stem bark of *Clidion Nitidum*. *Asian Journal of pfarmaceutical and clinical research*.7(2)
- **Mole S et Waterman PG**. (1987). A critical analysis of techniques of measuring tamnius in ecological studies. II. Techniques of biochemically defining tamnius. *Oecologia*. 72: 148-156.
- **Morris CJ.** (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*. 225: 115-121.
- **Moulin M et Coquerel A.** (2002). Médicaments anti-inflammatoires. In : Pharmacologie. 2ème Edition. Paris.
- **Murphy KN., Reddy K V., Veigas J M et Murthy UD**. (2004). Study on wound healing activity of Punica granatum peel. *Journal of Medicinal Food*. 7(2): 256-9.
- **Mutter D et Marescaux J.** (2001). Gastrectomies pour cancer : principes généraux, anatomie vasculaire, anatomie lymphatique, curages. *Encyclopédie médico-chirurgicale.* (Editions scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), technique chirurgicales – Appareil digestif. 40-330-A. p.8.

N

- **Naisbitt DJ., Sanderson LS., Meng X., Stachulski AV., Clarke SE et Park BK.** (2007). Investigation of the immunogenicity of diclofenac and diclofenacmetabolites. *Toxicology Letters*. 168: 45-50.
- **Neal M.** (2013). Médicaments qui agissent sur le tractus gastro-intestinal. In : Pharmacologie médicale. 4ème Edition. *Boeck*. Holland. p. 30-31.
- **Ngenge T., Domgnim E., Talla E., Vernyuy T., Mbafor T., Popova M et Bankova V.** (2016). Chemical Constituents and Anti-ulcer Activity of propolis from the North-West Region of Cameroon. *Research journal of phytochemistry*.10: 45-57.
- **Niho N., Shibutani M., Tamura T., Toyoda K., Uneyama C., Takahashi N et Subchronic M.** (2001). toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 39(11): 1063-1070.
- **Niki L., Reynaert S., Aesif W., Amy TM., Emiel B., Wouters FM., Irvin CG., Yvonne MW et Janssen-Heininger.** (2007). Catalase over expression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. *The journal of Immunology*.178 : 3814 – 3821.

O

- **Ohkawa H., Ohishi N et Yagi K.** (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95: 351-358.
- **Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S et Chowwanapoonpohn S.** (2007). Comparison of antioxidant capacities andcytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*. 103: 839-84.
- **Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S., Chowwanapoonpohn S**. (2007). Comparison of antioxidant capcities andcytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*.103: 839-846.
- **Olajide OA., Awe SO., Makinde JM., Ekhelar AI., Olusola A., Morebise O et Okpako DT.** (2000). Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*. 71(1-2): 179-186.
- **Omobowale TO., Oyagbemi AA., Ajufo UE., Adejumobi OA ., Ola-Davies OE., Adedapo AA et Yakubu MA.** (2018). Ameliorative Effect of Gallic Acid in Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats Through Antioxidant Defense System. *Journal of Dietary Supplements*. 15(2): 183-196.

- **Ossipov V., Salminen J ., Ossipova S., Haukioja E et Pihlaja K.** (2003). L'acide gallique et les tanins hydrolysables sont formés dans les feuilles de bouleau d'un composé intermédiaire de la voie du shikimate. *Systématique biochimique et écologie*. 31: 3-16.
- **Otterness IG.** (1994). The value of C-reactive protein measurement in rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 24(2): 91-104.

P

- **Pei CH., Tsung SY et Ju-Ching C.**(2015). Anti-inflammatory activity of neral and geranial isolated from fruits of Litsea cubeba Lour.*Journal of Functional Foods.* 19:248-258
- **Pacheco-Palencia LA., Noratto G., Hingorani L., Talcott ST et Mertens-Talcott SU.** (2008). Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.,) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 8434-8441.
- **Pailler JL., Brissiaud JC., Jancovovici R et Vica PH.** (1990). Radio diagnostic des perforations d'ulcère. *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Paris-France .p.10-20.
- **Palafox-Carlos H., Gil-Ch´avez J., Sotelo-Mundo R., Namiesnik J., Gorinstein S et Gonz´alez-Aguilar GA.** (2012). Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in 'Ataulfo' Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids .*Molecules*.17: 12657–12664.
- **Palier C., Clémence G., Corroyer M et Parlier-Cuau C.** (2012). Anatomie du tube digestif. *Boeck*. p. 699.
- **Panneerselvam S et Arumugam G.** (2011). A biochemical study on the gastroprotective effect of hydroalcoholic extract of *Andrographis paniculata* in rats. *Indian Journal Pharmacologie.* 43(4) : 402-408.
- **Patel C., Dadhaniy P., Hingorani L et Soni MG.** (2008). Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology* .46 :2728-2735.
- **Patrignani P., Tacconelli S., Bruno A., Sostres C et Lanas A**. (2011). Managing the adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 4(5) : 605-621.
- **Pereira-Leite C., Nunes C., Jamal SK., Cuccovia IM et Reis S.** (2016). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Therapy: A Journey Toward Safety. *Medicinal Research Reviews*. 37(4): 802–859.
- **Perlemuter G., Perlemuter L., Pitard L et Quevauvilliers J.** (2011). Anti inflammatoires stéroidiens et non stéroidiens. In : Pharmacologie et thérapeutiques. *Elsevier Masson*. Italie.

- **Perlemuter G., Perlemuter L., Pitard L et Quevauvilliers J.** (2011). Antiinflammatoires stéroidiens et non stéroidiens. In : *Pharmacologie et thérapeutiques*.Edition *Elsevier Masson*. Italie. p. 133-134.
- **Pillai NR.** (1992). Anti-diarrhoea1 Activity of *Punica granatum* in Experimental Animals. *International Journal of Pharmacognosy*. 3: 201-204.
- **Pinheiro AJMCR., Sá Gonçalves J., Dourado AWA., Sousa MD., Brito MN., Silva K., Batista MCA., Cortez de Sá J., Monteiro CRAV., Soare Fernandes E., Monteiro-Neto V., Campbell LA., Wiziack Zago PM et Lima-Neto LG.** (2018). *Punica granatum L*. Leaf Extract Attenuates Lung Inflammation in Mice with Acute Lung Injury. *Journal of Immunology Research*. p. 1-11.
- **Pisoschi AM et Pop A.** (2015). The role of antioxidants in the chemistry ofoxidative stress : A review. *European journal of Medicinal Chemistry*. 97: 55-74.
- **Pocock et Richards (2004).** Physiologie humaine les fondements de la médecine. *Elsevier Masson*. Paris. p.409-418.
- **Popovici C., Saykova I et Tylkowskib.** (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*. (4) : 1–8.
- **Poyrazoglu E., Gökmen V et Artk N.** (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (Punicagranatum L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis.* 15: 567−575.
- **Prashanth D., Asha MK et Amit A**. (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum. Fitoterapia*. 72: 171-173.
- **Prince PSM., Priscilla H et Devika PT.** (2009). Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*. p. 139-143.
- **Putz R et Pabst R.** (2006). Viscères abdominaux. In : Sobotta. Atlas d'anatomie humaine. Tome 2. 5ème Edition .*médicales internationales*. p. 130.

R

- **Rajalakshmi K., Devaraj H. ET Niranjali Devaraj S.** (2001). Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice. *Food and Chemical Toxicology* 39: 919-922.
- **Rajan S, Mahalakshmi S., Deepa VM., Sathya K., Shajitha S et Thirunalasundari T.** (2011). Antioxidant potentials of *Punica granatum* fruit rind extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 3(03): 82-88.

- **Ramao L., Tovar J., Fonseca SG., Moraes RH., Cruz AK., Hothersall JS., Noronha- Dutra AA ., Ferreira SH et Cunha FQ**. (2006). Gluthathione and the redox control system trypanothione/ trypanothione reductase are involved in the protection of Leishmania spp. against nitrosothiol-induced cytotoxity. *Brazilian Journal of Medical and Biological*. 39(3): 355-363.
- **Rambaud JC.** (2000). Physiologie de la maladie ulcéreuse duodénale et gastrique. Dans le traité de gastroentérologie. *Flammarion*. Paris. p. 331.
- **Reddy M., Gupta S., Jacob M., Khan S et D Ferreira.** (2007). "Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from Punica granatum L.,". *Planta Medica*. 73(5): 461-467.
- **Ribéreau-Gyon G.** (1968). Etude des mécanismes de synthèse et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique chez *vitis vinifera* L. *Phytochemistry*.7 : 1471-1482.
- **Rodriguez-Bernaldo AQFS., Frecha PA., Vidal et Lopez H J**. (2010). Antioxydant compounds in edible brown seweeds. *European Food Research & Technology*. 231(3): 495-498.
- **Roy S., Siahpirani AF., Chasman D., Knaack S3., Ay F., Stewart R., Wilson M et Sridharan RA**.(2015). predictive modeling approach for cell line-specific long-range regulatory interactions. *Nucleic Acids Research*. 43(18): 8694-712.
- **Rozza AL., Hiruma-Lima CA., Tanimoto A et Pellizzon CH.** (2012). Mophologic and Pharmacological Investigations in the Epicatechin Gastroprotective Effect. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. p. 8.
- **Ryan MT., Muller H et Pfanner N.** (1999). Functionalstaging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (29): 20619-20627.

- **Saha L., Bhatia A et Chakrabarti A.** (2016). Gastroprotectiveeffect of bezafibrate, a peroxisomeproliferatoractivatedreceptor α agonist and itsmechanism in a rat model of aspirin-inducedgastriculcer. *Advances in Digestive Medicine.* 3(3): 101-110.
- **Saiah W., Halzoune H., Djaziri R., Tabani K., Koceir EA et Omari N.** (2017). Antioxidant and gastroprotective actions of butanol fraction of Zingiber officinale against diclofenac sodium-induced gastric damage in rats. *Journal of Food Biochemistry*.42: 1-12.
- **Salwe KJ., Sachdev DO., Bahurupi Y et Kumarappan M.** (2015). Evaluation of antidiabetic, hypolipedimic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of Punica granatum in male Wistar albino rats. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*.6(1): 56-62.

- **Samsong W**. (1980). Physiologie appliqué à la médicine. Médecine-science. *Edition Flammarion*. Paris. p. 475- 480.
- **Sanmugapriya E et Venkataraman S.** (2006). Studies of hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychonospotatorum linn*. Seeds on CCl4 induced acute hepatic injury inexperimental rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 105: 154 -160.
- **Sartippour MR., Seeram NP., Rao JY., Moro A., Harris DM., Henning SM., Firouzi A., Rettig MB., Aronson WJ., Pantuck AJ et Heber D.** (2008). Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Oncology*. 32: 475-480.
- **Savegnago L., Trevisan M., Alves D., Batista Teixeira Rocha J., Nogueira CW et Zeni G.** (2006). Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 21(1): 86-92.
- **Scheiman JM et Nsaid S.** (1996). Gastrointestinal injury, and cytoprotection. In: Dubois RN, Giardiello FM. Editors NSAIDs Eicosonoids, and the Gastroenteric Tract. *Philadelphia*. 25: 279–98.
- **Schrader M et Fahimi DH**. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1793: 1755-1766.
- **Schubert SY., Lansky EP et Neeman I.** (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* .66(1): 11-7.
- **Seeram NP et Nair MG**. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure capacity related studies of the dietary constituent's anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(19): 5308–5312.
- **Seeram NP., Adams LS., Henning SM., Niu Y., Zhan Y., Nair MG et Heber D**. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin. ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 16: 60–367.
- **Seeram NP., Adams LS., Zhang Y., Lee R., Sand D., Scheuller HS et Heber D.** (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 9329–9339.
- **Sen S., Asokkumar K.,Umamaheswari M., Sivashanmugam À et Subhadradevi V.** (2013). Effet antiulcérogène de l'acide gallique chez le rat et son effet sur les paramètres oxydants et antioxydants dans le tissu de l'estomac. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 75(2): 149-155.

- **Shen Y., Sun J., Niu C ., Yu D ., Chen Z ., Cong W et Geng F.** (2017). Mechanistic evaluation of gastroprotective effects of Kangfuxin on ethanol-induced gastric ulcer in mice, *Chemico-Biological Interactions*. 273 :115-124.
- **Shiban MS., Al-Otaibi MM et Al-Zoreky NS.** (2012). Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences.* 3(7): 991.
- **Shukla M., Gupta K., Rasheed Z., Khan KA et Haqqi TM.** (2008). Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutrition Journal.* 24: 733–743.
- **Sibi PI et Ann SP.** (2016). Gastroprotective effect of plumbagin and ethanolic extract of plumbaginales in experimentally-induced ulcer. *Journal of Herb Med Pharmacology*. 5(3) :92-98.
- **Sichel G., Corsaro C., Scalia M., DiBilio AJ et Bonomo RP.** (1991). In vitro scavengeractivityof someflavonoids and melaninsagainst $O2^{\bullet}$. *Free Radical Biology and Medicine*. 11: 1–8.
- **Silbernalg S et Lang F.** (2012). Atlas de poche de pysiopathologie. 2ème Edition. *Flammarion médecine science.* Paris. p.156.
- **Singh A., Holvoet S et Mercenier A.** (2011). Polyphénols alimentaires dans la prévention et le traitement des maladies allergiques. *Clinical & Experimental Allergy*. p. 1346-1359.
- **Singleton VL et Rossi JA.** (1965). Indice de Folin, polyphenols totaux. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 16: 144-158.
- **Sinha M., Gautam L., Shukla PK., Kaur P., Sharma S et Singh TP.** (2013). Current perspectives in NSAID-induced gastropathy. *Mediators of Inflammation*. p. 258 -209.
- **Siquet C., Paiva-Martins F., Lima JLFC., Reis S et Borges F.** (2006). Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-A structure–activity relationship study. *Free Radical Research.* 40 :433–442.
- **Skoog DA., Holler FJ et Nieman TA.** (2003). Principes d'analyse instrumentale. 1ère Edition. *De Boeck Université*. p. 945.
- **Sogni P.** (2010). Gastro-entérologie hépatologie. In **:** Thérapeutique pratique 2010. 20eme Edition. *MED-LINE Editions*. p. 293-296.
- **Søreide K., Thorsen K., M Harrison E., Bingener J., Møller M., Yeboah MO et Søreide J.** (2015). Perforated peptic ulcer. *Emergency surgery*. 2(386): 1288–98.
- **Souleman AMA et Ibrahim GE**. (2016). Evaluation of Egyptian pomegranate cultivars for antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents. *Egyptian Pharmaceutical Journal.* 15(3): 143-9.
- **Sowndhar Rajan B., Manivasagam S., Dhanusu S., Chandrasekar N., Krishna K., Kalaiarasu LP., Babu AA et Vellaichamy E.** (2018). Diet with high content of advanced

glycation end products induces systemic inflammation and weight gain in experimental mice: Protective role of curcumin and gallic acid. *Food and Chemical Toxicology*.114: 237-245.

- **Spichiger R-E et Savolenen V.** (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. *Presses polytechniques et universitaires romandes* .p. 413.
- **Sroka Z et Cisowski W.** (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*. 41 : 753–758.
- **Stowe CB**. (2011). The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. *Complementary Therapies in Clinical Practice.* 17(2) : 113-115.
- **Su MS., Shyu YT et Chien PJ.** (2008). Antioxydant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chemistry*. 111(4): 892-896.
- **Subramaniana A ., Johna A., Vellayyapana M., Balajia A ., Jaganathan S., Supriyantoa E et Mustafa Y.** (2015). Gallic Acid: Prospects and the molecular mechanisms of its anticancer activity. *The Royal Society of Chemistry.* p. 8-11.
- **Sultana B., Anwar F., Rafique M et Ali Shahid Chatha S.** (2008). Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas y aceites*. 59(3): 205-217.
- **Sumbul S., Ahmad MA., Mohd A et Mohd A.** (2011). Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*. p. 361–7.
- **Suzuki H., Iwasaki E. ET Hibi T.** (2009). Helicobacter pylori and gastric cancer. *Gastric Cancer*. 12: 79–87.
- **Szelenyi I et Brune K.** (1988). Possible role of oxygen radicals in ethanol induced gastric mucosal damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 33 : 865–871.

T

- **Tehranifar A., Zarei M., Nemati Z., Esfandiyari B et Vazifeshenas MR.** (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant capacity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars. *Scientia Horticulturae*. 126(2): 180-185.
- **Teixeira J., Silva T., Benfeito S., Gaspar A., Garrido EM., Garrido J et Borges F.** (2013). Exploring nature profits: development of novel and potent lipophilic antioxidants based on galloyl-cinnamic hybrids. European Journal of Medicinal Chemistry. 62 : 289–296.
- **Todd PA et Sorkin EM.** (1988). Diclofenac sodium. *Drugs*. p. 244–285.
- **Torres De Pinedo A., Pen alver P et Morales JC.** (2007) Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chemistry*. 103 : 55–61.
- **Tremellen K.** (2008). Oxidative stress and male infertilitya clinical perspective. *Human reproduction update.* 14 (3): 243–258.

- **Tripathi SM et Singh DK.** (2000). Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. *Brazilian. Journal of Medical and Biological Research* .33: 1351-1355.
- **Turk G., Sonmez M., Aydin M., Yuce A., Gur S et Yuksel M.** (2008). Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 27: 289-296.

V

- **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M et Telser J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functionand human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 39: 44 – 84.
- **Vander A.** (2001). Human physiology. In : the mechanism of body. *The McGraw-Hill Companies*. San Francisco. p. 143 – 240.
- **Verma RJ et Nair A.** (2001). Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian Journal of Andrology*. 3(3): 217-21.
- **Verma S., Singh A et Mishra** A**.** (2013). Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. p. 473–485.
- **Vidal A., Fallarero A., Pena BR., Medina ME., Gra B., Rivera F., Gutierrez Y et Vuorela PM.** (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology* .89: 295-300.
- **Viuda-Martos M., Fernández-López J et Pérez-Álvarez JA.** (2010). Pomegranate andits Many Functional Components as Related to Human Health. *A Review Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 9: 635−654.

W

- **Wang ML., Wang JT et Choong YM**. (2004). A rapid and accurate method for determination of methanol in alcoholic beverage by direct injection capillary gas chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17: 187–196.
- **Wantana R., Tassanee N et Subhadhirasakul S.** (2009). Antinociceptive, antipyretic, and anti infammatory activities of Putranjiva roxburghii Wall. leaf extract in experimental animals. *Journal of Natural Medicines*. 23: 290-6.
- **Werner I., Bacher A et Eisenreich W.** (1997). Retrobiosynthetic NMR studies with 13C-labeled glucose. Formation of gallic acid in plants and fungi. *The Journal of Biological Chemistry*. 25474–25482.

- **Werner RA., Rossmann A., Schwarz C., Bacher A., Schmidt HL et Eisenreich W.** (2004). Biosynthesis of gallic acid in Rhus typhina: discrimination between alternative pathways from natural oxygen isotope abundance. *Phytochemistry*. 65: 2809–2813.
- **Winter C A., Risley EA et Nuss GW.** (1963). Carragenine-induced edema *in* indpaw of rat as an assay for anti-inflammatory drug. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 141: 369-373.

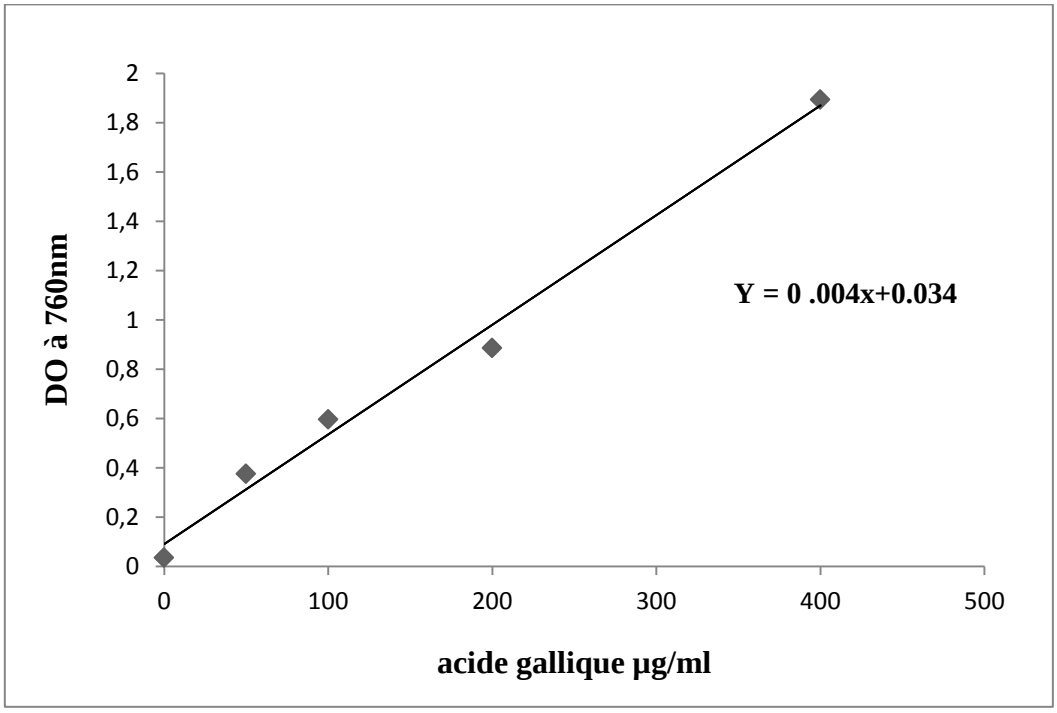
𝒴

- **Yen GC., Duh PD et Tsai HL.** (2002). Propriétés antioxydantes et pro-oxydantes de l'acide ascorbique et de l'acide gallique. *Nourriture Chemistry*. p. 307-13.
- **Yoshimura M., Watanabe Y., Kasai K., Yamakoshi J et Koga T.** (2005).Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. *Biosci Biotechnol Biochem.*69: 2368-2373.

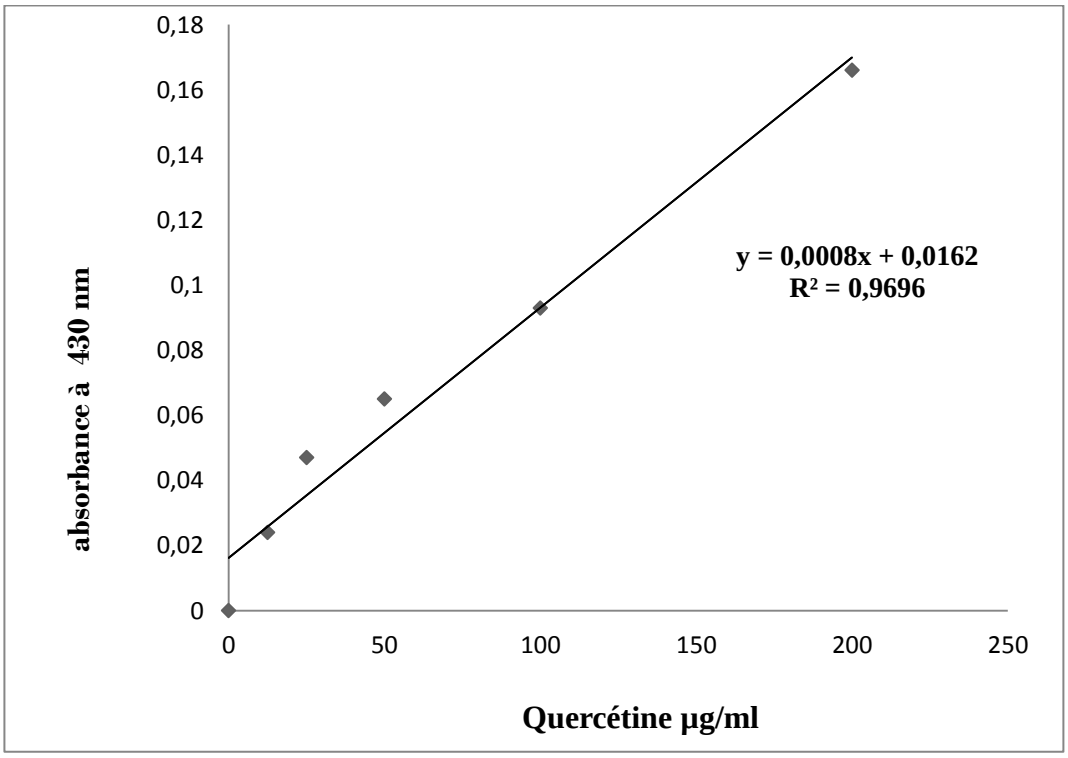
𝒵

- **Zahin M., Aqil F et Ahmad I.** (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research.* 703: 99-107.
- **Zarfeshany A., Asgary S et Javanmard SH**. (2014). Potent health effects of pomegranate. *Advanced Biomedical Research*. 3: 100.
- **Zeitoun JP., Chryssostalis A et Lefever J.** (2014). Hépatologie Gastro-Entérologie Chirurgie Digestive. *Vernazobres-Grego*. p.21.
- **Zhao L., Chen J., Su J., Li L., Hu S., Li B., Zhang X., Xu Z et Chen T.** (2013). *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of 5-hydroxymethylfurfural. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61:10604–10611.

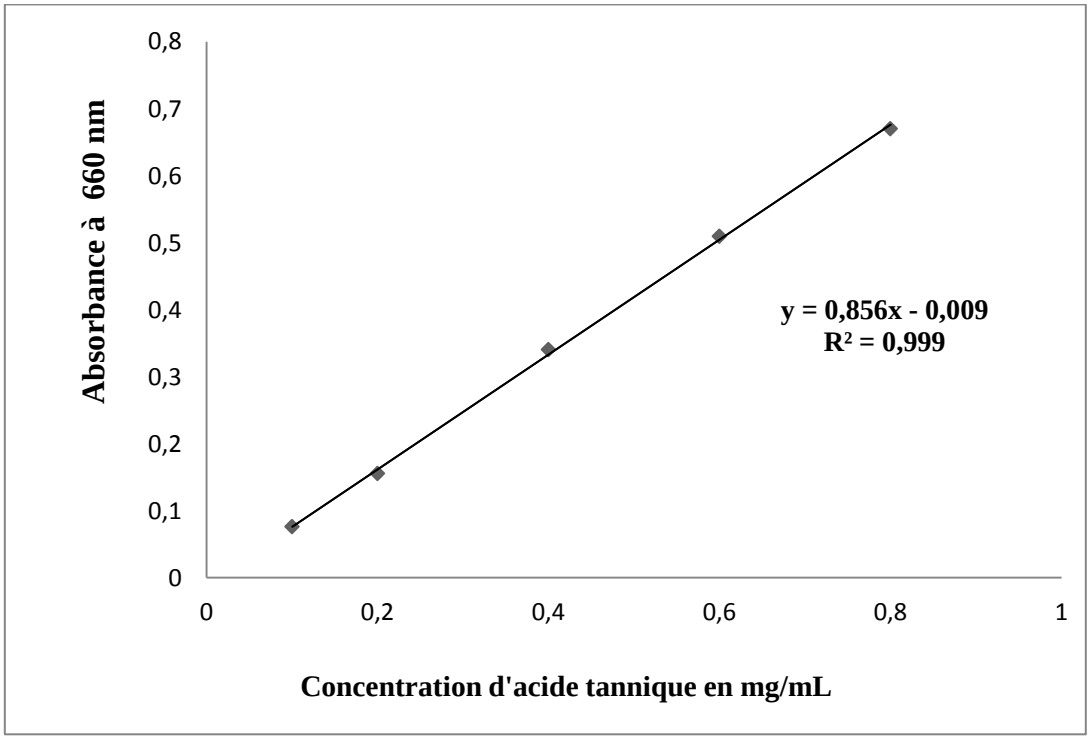
Annexe



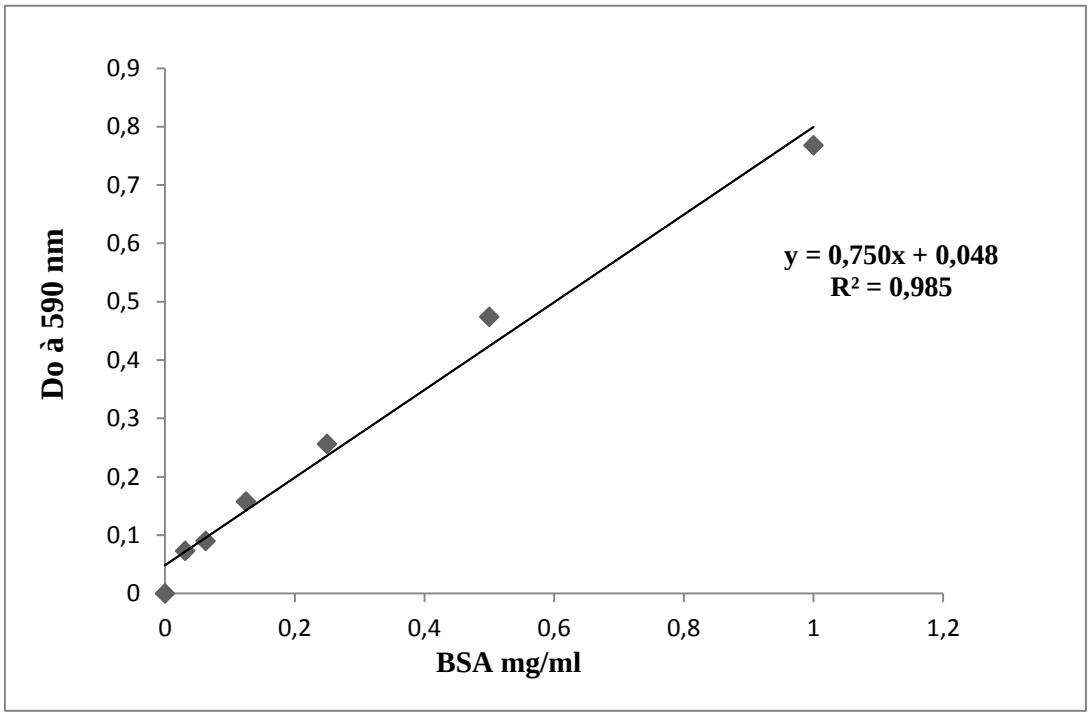
Annexe 1. Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols (acide gallique comme standard).



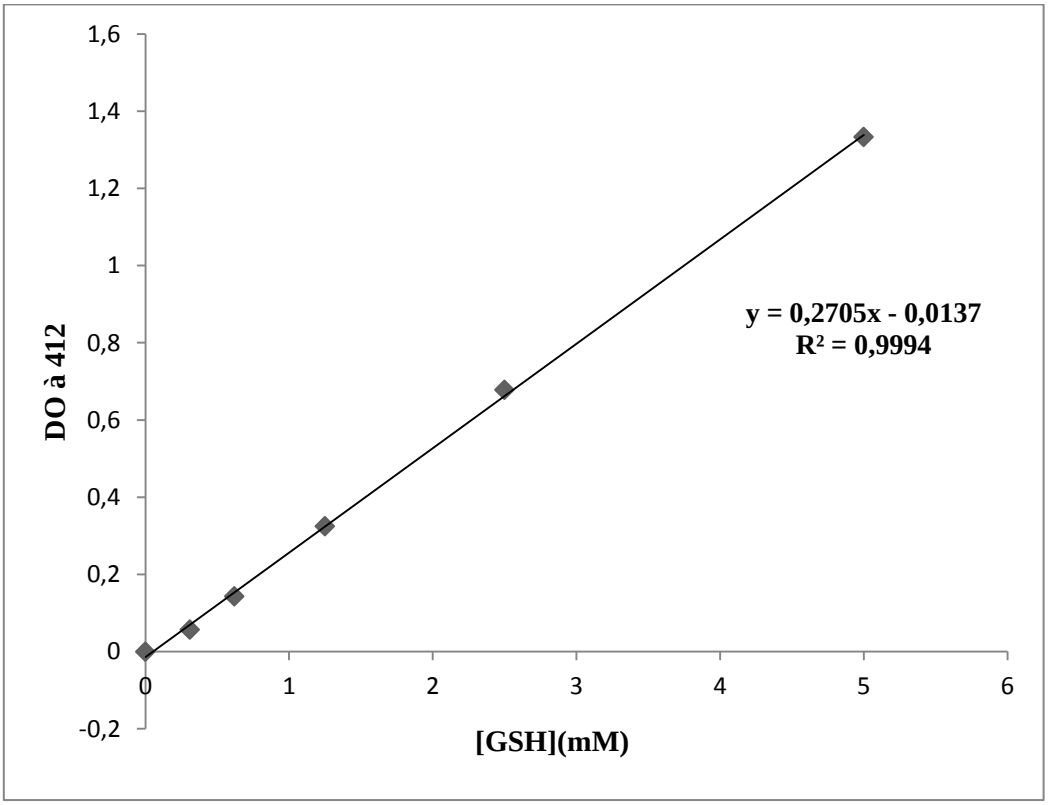
Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de dosage des flavonoïdes en µg/ml (quercétine comme standard), (moyennes de 3 essais).



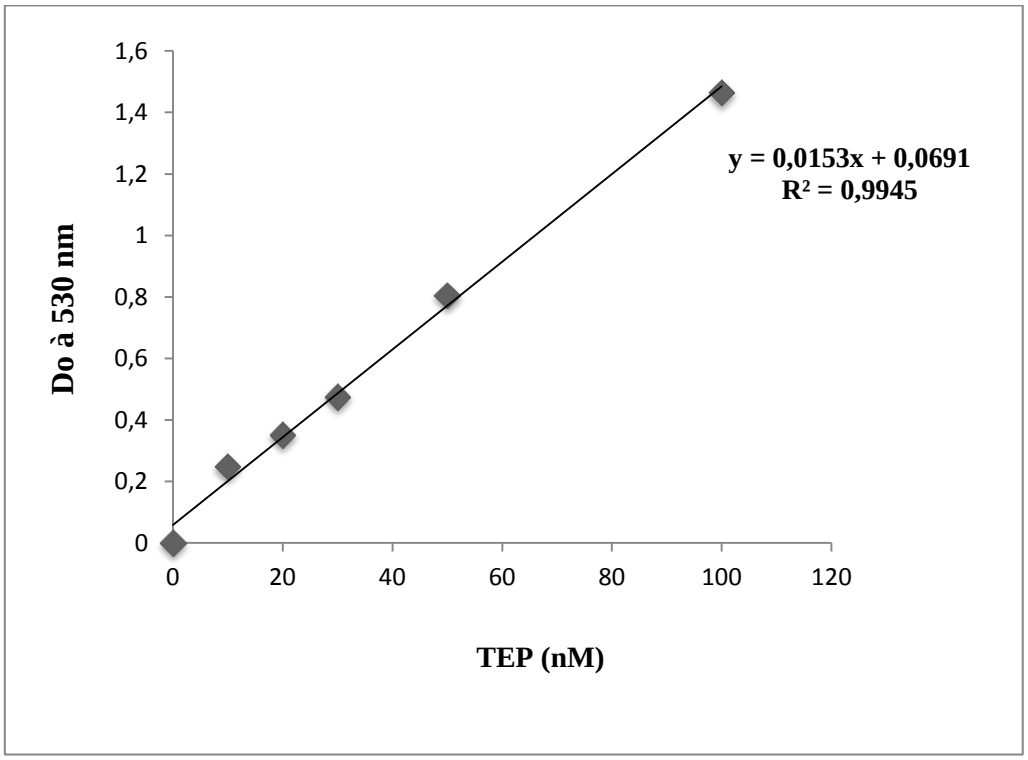
Annexe 3. Courbe d'étalonnage du dosage des tanins hydrolysables (acide tannique comme standard).



Annexe 4. Courbe d'étalonnage des protéines (BSA comme standard).



Annexe 5. Courbe d'étalonnage de glutathion.



Annexe 6. Courbe étalon du MDA (TEP comme standard).

Réalisée par :

- BOUCHICHA Messaouda
- BOUNAMIS Sadjia

Encadré par :

Mme KEBSA W.

Evaluation de l'effet anti-ulcérogène et gastroprotecteur de l'acide gallique et de l'écorce de grenade (*Punica granatum*) contre l'ulcère induit par le Diclofénac chez le rat *albinos wistar*

Résumé

L'ulcère gastrique est une perte de substance au niveau gastrique allant jusqu'à la destruction de la muqueuse et la mise à nue de la musculeuse. La présente étude vise à évaluer l'effet gastro-protecteur de l'écorce de grenade et de l'acide gallique contre l'ulcère gastrique induit par le Diclofénac (DCF) chez le rat *albinos wistar*. L'étude phyto-chimique a montré que l'extrait méthanolique de *Punica granatum* (EMEP) est très riche en polyphénols et en tanins hydrolysables. Il possède avec l'acide gallique (AG) une activité anti-radicalaire concentration dépendante contre le radical libre DPPH° et contre le F^{2+} avec des IC_{50} de 58,16 µg/ml et 62,34 µg/ml respectivement. Le diclofénac à la dose de 150 mg/kg induit chez l'animal un ulcère gastrique accru caractérisé par une altération des paramètres gastriques, une élévation du (MDA) comme principal marqueur de la péroxydation lipidique et une diminution des systèmes de défense antioxydant (GSH, CAT, SOD, GST, GPx). Le prétraitement par l'EMEP, l'AG à 100 mg/kg, ou par l'oméprazole à 20 mg/kg, entraîne une nette amélioration des paramètres gastriques et ceux du statut antioxydant dans l'estomac. L'étude histologique a confirmé la toxicité du DCF par l'apparition des altérations tissulaires sévères dans les portions glandulaires de l'estomac et, l'effet cyto-protecteur de l'EMEP et de l'AG par la réduction de ces dommages. D'autre part, l'EMEP et l'acide gallique ont été testés contre l'inflammation sur un modèle d'œdème aiguë de la patte de rat induit par la carragénine à 1%. L'EMEP et de l'acide gallique administrés par voie orale à la dose de 200 mg/kg ont montré un effet anti-inflammatoire significatif après une heure de traitement. Ces données confirment que l'EMEP et l'AG présentent une forte activité anti-ulcéreuse, anti-oxydante et anti-inflammatoire et peut devenir une nouvelle alternative thérapeutique pour les ulcéreux.

Mots clés : Ulcère gastrique, Diclofénac, EMEP, acide gallique, stress oxydant.

Abstract

Gastric ulcer is a loss of substance the gastric level up to the destruction of the mucous membrane and muscularis bare. The present study aims to evaluate the gastroprotective effect of pomegranate bark and gallic acid against gastric ulcer induced by Diclofenac (DCF) in albino wistar rats. The phytochemical study showed that the methanolic extract of Punica granatum (EMEP) is very rich in polyphenols and hydrolysable tannins. It possesses with gallic acid (AG) a concentration dependent antiradicalar activity against free radical DPPH ° and against fe^{+3} with IC50 of 58.16 µg /ml and 62.34 µg / ml respectively. Diclofenac at 150 mg / kg induces an increased in gastric ulcer in rats characterized by altered gastric parameters, elevated of (MDA) as a marker of lipid peroxidation, and decreased in antioxidant defense systems (GSH , CAT, SOD, GST, GPx). Pretreatment with EMEP 100 mg/kg, GA100 mg/kg, or omeprazole 20 mg/kg resulted in significant improvement in gastric parameters and stomach antioxidant status. The histological study confirmed DCF toxicity by the appearance of severe tissue alterations in the stomach glandular portions and also the cytoprotective effect of EMEP and AG by the reduction of these damages. On the other hand, EMEP and gallic acid were tested against inflammation on an acute carrageenan-induced rat paw edema model. EMEP and gallic acid administered orally at 200 mg /kg showed a significant anti-inflammatory effect one hour after treatment. These data indicated that EMEP and AG exhibit strong anti-ulcer, anti-oxidant, and anti-inflammatory activities and may become a new therapeutic alternative for ulcer patients.

Key words: Gastric ulcer, Diclofenac, EMEP, gallic acid, oxidative stress.

الملخص

تعتبر قرحة المعدة فقدان من مادة جدار المعدة تصل الى عمق عضلات النسيج. تهدف هذه الدراسة الى تقييم تأثير قشور الرمان وحمض الغاليك على قرحة المعدة التي يسببها الديكلوفيناك عند جرذان التجارب. أظهرت الدراسة النباتية الكيميائية أن المستخلص الميثانولي لقشور الرمان غني جدا بمتعددات الفينول والعفص القابل للتحلل ويملك مع حمض الغاليك تأثير آسر ضد الجذور الحرة ° DPPH و Fe^{+3} متعلق بالتركيزحيث تقدر ال IC_{50} ب 58,16 و 62,34 ميكروغرام / مل على التوالي. استخدام الديكلوفيناك بجرعة 150 ملغ/ كغ عند جرذان التجارب تسبب في ظهور قرحة معدية شديدة تتميز بتغير معايير المعدة ,ارتفاع في مستوى MDA كدليل على تأكسد الدهون وانخفاض في أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة (GSH,GPX,GST,SOD,CAT) .أدت المعالجة المسبقة بالمستخلص الميثانولي لقشور الرمان و حمض الغاليك بجرعة 100 مغ/كغ اوالاوميبرازول 20 مغ/كغ الى تحسن كبير في معايير المعدة و مضادات الاكسدة. وأكدت الدراسة النسيجية سمية الديكلوفيناك من خلال ظهور تغيرات نسيجية حادة على مستوى المعدة, كما اكدت التأثير الوقائي للمستخلص الميثانولي لقشور الرمان وحمض الغاليك عن طريق الحد من هذا الضرر النسيجي. من ناحية اخرى تم اختبار المستخلص الميثانولي لقشور الرمان و حمض الغاليك عن طريق الفم بجرعة 200 مغ/كغ ضد الالتهاب الحاد في راحة قدم الجردان الناجم عن حقن الكاراجينين 1%. حيث أدى هذا العلاج إلى تحسن ملحوظ في حالة الإلتهاب بعد ساعة واحدة من العلاج. تؤكد هذه النتائج ان المستخلصين يظهران نشاطا وقائيا قويا ضد القرحة المعدية من خلال نشاطهما المضاد للأكسدة والمضاد للالتهاب الذى يؤهلهما ان يصبحا علاجا بديلا لأمراض القرحة المعدية.

الكلمات المفتاحية : قرحة المعدة, ديكلوفيناك , المستخلص الميثانولي لقشور الرمان, حمض الغاليك, الاجهاد التاكسدي.