

**UNIVERSITÉ SULTAN MOULAY SLIMANE
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

&

FACULTÉ POLYDISCIPLINAIRE

-BÉNI MELLAL-

Département de Biologie

ANNÉE : 2022

THÈSE N° : 441/22

**CENTRE D'ÉTUDES DOCTORALES SCIENCES ET TECHNIQUES
FORMATION DOCTORALE : RESSOURCES NATURELLES ENVIRONNEMENT ET SANTÉ**

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

Mlle. Lamiae BENCHAGRA

Intitulée

**EFFET DE LA GRENADE MAROCAINE (*Punica granatum*)
SUR LE PROCESSUS OXYDATIF ET LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE
DU CHOLESTÉROL. APPLICATION THÉRAPEUTIQUE
TRAITEMENT PRÉVENTIF DE L'ATHÉROSCLELOSE**

Monsieur Ahmed AIT CHAOUI, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, **Président/Rapporteur** ;

Monsieur Abdelrhani MOKHTARI, Professeur, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra, **Rapporteur** ;

Monsieur Ahmed ADLOUNI, Professeur, Faculté des Sciences Ben M'sik, Université Hassan II, Casablanca, **Rapporteur** ;

Monsieur Abdelmajid SOULAYMANI, Professeur, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra, **Examineur** ;

Monsieur Hicham HARNAFI, Professeur, Faculté des Sciences, Université Mohammed Premier, Oujda, **Examineur** ;

Madame Samira BOULBAROUD, Professeur, Faculté Polydisciplinaire, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, **Co-Directeur de thèse** ;

Monsieur Hicham BERROUGUI, Professeur, Faculté Polydisciplinaire, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, **Directeur de thèse**.

À mes chers parents,
merci pour votre amour et
votre soutien, merci de m'avoir
donné la force nécessaire pour aller
jusqu'au bout...

Remerciements

Durant ces six années de thèse, j'ai compris que la considération inconditionnelle de l'autre était le fondement des relations humaines. Le travail de recherche m'a beaucoup apporté, mais au-delà de ça, j'ai pu partager mes heures et mes journées avec des personnes extraordinaires. Pour leur aide, leurs conseils, leur accompagnement, leurs réponses, leur soutien, leur réconfort, ou juste leur sourire et leur gentillesse, je remercie ici toutes ces personnes qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout...

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Allah le tout puissant, merci de m'avoir accordé la force et la patience d'aller jusqu'au bout de mon rêve et le bonheur d'achever ce travail.

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, sur place ou à distance, au succès de ce doctorat. Merci à chacun d'entre vous.

Je voudrais remercier tout d'abord:

Pr. **Nabil HMINA**, Président de l'Université Sultan Moulay Slimane de Béni Mellal pour sa rigueur dans la gestion de l'Université et sa stratégie pour la formation de qualité des étudiants.

Pr. **Said MELLIANI**, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal pour les efforts et le soutien qu'il ne cesse d'accorder à la formation et la recherche scientifique au sein de la faculté.

Pr. **Benachir EL HADADI**, Doyen de la Faculté Polydisciplinaire de Béni Mellal pour le soutien qu'il ne cesse d'accorder à la recherche scientifique au sein de l'établissement.

Je voudrais dans un premier temps remercier mon directeur de thèse **Pr. Hicham BERROUGUI** pour sa patience, sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. **Pr. BERROUGUI** a toujours été très ouvert à mes propositions, idées et hypothèses, ce que j'interprète comme une grande marque de confiance envers mon travail. Le sentiment de confiance que j'ai ressenti de sa part m'a permis d'avancer et d'apprécier toujours plus cet univers scientifique. Au cours de ces six ans, j'ai pu grandir, acquérir de l'expérience et saisir des opportunités uniques et gratifiantes. Merci infiniment **Pr. BERROUGUI** pour tout ce que vous avez fait.

Je remercie également **Pr. Ahmed RAMCHOUN** pour l'aide qu'il a fourni et les connaissances qu'il a su me transmettre en ce qui concerne les manipulations dans le laboratoire, aussi pour sa disponibilité permanente afin de répondre avec calme et patience à

mes questions, ses nombreux conseils, et son soutien. J'ai beaucoup appris grâce à leur professionnalisme et leur savoir-faire.

Je voudrais remercier **Pr. Samira BOULBAROUD** pour son écoute, son aide, sa présence, ses précieux conseils, ses orientations, ses encouragements et ses critiques constructives pour me lancer dans ce parcours et le mener à bien. Merci infiniment.

Je voudrais remercier **Pr. Abdelouahed HAJJAJI** pour sa bienveillance à mon égard, sa disponibilité, ses conseils, et pour sa patience à finir ce travail. Je tiens aussi à le remercier sur sa confiance, ses encouragements tout au long de ces années en respectant toujours mes choix font que je me suis toujours sentie à l'aise.

Je tiens à remercier aussi les **membres du jury** pour leur présence, pour leur lecture attentive de ma thèse ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail de recherche.

À mes parents, que je ne saurais comment remercier... À tous ces moments magiques avec eux qui sont toujours trop courts, à leur amour, leur protection, leur tendresse, et l'équilibre qu'ils m'ont apporté depuis toutes ces années. Jour après jour je n'oublie pas tout ce qu'ils ont fait et font encore pour moi, toutes ces choses qui me permettent de vivre tout ça aujourd'hui.

À mon père, que je remercie pour tout ce qu'il m'apporte et appris, pour son humanité, sa patience et son écoute, un amour discret mais tellement immense.

À ma mère, unique au monde, un modèle d'amour, de générosité, de partage et de considération de l'autre.

Liste des publications

- Article 1: **L. Benchagra**, A. Ramchoun, A. Hajjaji, A. Khalil and **H. Berrougui**. Beneficial Effects of Pomegranate Fruit Consumption in Cardiovascular Diseases Prevention. *Journal of Natural Therapeutics*. 2018, 7. 84-94.
- Article 2: **L. Benchagra**, A. Ramchoun, A. Hajjaji, A. Khalil, and **H. Berrougui**. Antihyperlipidemic Activity of *Punica granatum* l. Peels in Triton WR-1339 Induced Hyperlipidemic Rats. *Clinica Chimica Acta* 493 (2019) S76 – S84. (IF:6,314)
- Article 3: **Benchagra L.**, Khalil A., Islam O. Md., Ramchoun M., Boulbaroud S., Hajjaji A., Fülöp T., Ferreti G. and **Berrougui H.** Antioxidant Effect of Moroccan Pomegranate (*Punica granatum* L. Sefri variety) Extracts Rich in Punicalagin against the Oxidative Stress Process. (Manuscript ID: Foods-1269242). (IF: 5,561)
- Article 4 (en cours de soumission): **Benchagra L.**, Khalil A., Ramchoun M., Boulbaroud S., Hajjaji A., Fülöp T and **Berrougui H.** Antiatherogenic Effect of Punicalagin Polyphenolic Rich Extracts from Peels and Arils Pomegranate (*Punica granatum* L. Sefri variety) in *Wistar* Rats.
- Article 5 (en cours de soumission): Alami M., **Benchagra L.**, Khalil A., Boulbaroud S., and **Berrougui H.** Pomegranate (*Punica granatum* L.) and Neuroinflammation Involved in Neurodegenerative Diseases.

Liste des communications

Communications affichées

Conférences nationales

- **L. Benchagra, A. Hajjaji, A. Khalil and H. Berrougui. Cholesterol Efflux and Oxidative Stress Involvement in Pomegranate Prevention against Atherosclerosis.** Colloque International de l'Université Hassan 1^{er} Settat : « Substances naturelles : Stress et métabolismes cellulaires », 15-16 Décembre 2016.
- **L. Benchagra, A. Hajjaji, and H. Berrougui. Évaluation Biochimique de la Grenade Sefri d'Ouled Abdellah Région Béni Mellal (*Punica Granatum L.*).** Congrès National sur l'Innovation et le Management de la qualité des aliments, Faculté des Sciences Dhar Mahraz Fès, 28-29 Décembre 2016.
- **L. Benchagra, A. Ramchoun, A. Hajjaji, A. Khalil and H. Berrougui. Beneficial Effects of Pomegranate Fruit Consumption in Cardiovascular Diseases Prevention.** 6^{ème} École internationale de recherche, 19-21 Avril 2018 à la Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, Agadir.
- **L. Benchagra, A. Ramchoun, A. Hajjaji, and H. Berrougui. Phytochemical Screening and *in vitro* Evaluation of Antioxidant Activities of Pomegranate (*Punica Granatum L.*) peels.** The International Conference on Innovation, Quality and Safety of Food, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Fès, 28-30 Novembre 2018.
- **L. Benchagra, A. Ramchoun, A. Hajjaji, and H. Berrougui. Phytochemical Properties and *in vitro* Evaluation of Antioxidant Activity of Phenolic Rich Extract from Pomegranate (*Punica granatum L.*).** 2nd International Scientific Conference for Research and Ethics, theme: Cancer Research: Monitoring Therapeutics and Ethical Issues. Université Ibn Zohr, Faculté Polydisciplinaire de Taroudant, 19-20 Avril 2019.
- **L. Benchagra, A. Ramchoun, A. Hajjaji, A. Khalil and H. Berrougui. Évaluation de l'Activité Antioxydante et Hypolipémiante d'Extrait Riche en Composés Phénoliques de Grenadier (*Punica granatum L.*) : Étude chez le Rat *Wistar*.** La 7^{ème} édition de l'École Internationale de Recherche organisée sous le thème : Biodiversité, Biotechnologie et Développement Durable, du 25 au 27 Avril 2019 à la Faculté Des Sciences Agadir.

Conférences internationales

- **L. Benchagra, A. Ramchoun, A. Hajjaji, A. Khalil and H. Berrougui. Hypolipidemic Activity of Phenolic-Rich Extract From Pomegranate (*Punica Granatum L.*) in Triton WR 1339 Induced Hyperlipidemic Rat.** XVI Congress of the Iberian Society of Cytometry, Salamanca, Espagne, 9-11 Mai 2019.
- Participation au congrès international du Centre National Espagnol de Recherche Cardiovasculaire (CNIC): «**New Concept in Age-Related Cardiovascular Disease**», 24-26 Octobre 2019, Madrid, Espagne.

Abréviations

MCV	Maladies cardiovasculaires
LDL	Low density lipoprotein
HDL	High density lipoprotein
HMG-CoA réductase	Hydroxyméthylglutary-coenzyme A réductase
Apo	Apolipoprotéine
VLDL	Very low density lipoprotein
IDL	Intermediate density lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotéine a
LPL	Lipoprotéine lipase
sdLDL	Small dense LDL
lbLDL	Large buoyant LDL
rLDL	Récepteur de LDL
LCAT	Lécithine cholestérol acyle transférase
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
LDLR	LDL receptor
LRP	LDL-receptor related protein
VLDLR	VLDL receptor
PLTP	Phospholipid transfer protein
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
SR-B1	Scavenger receptor B1
PLA₂	Phospholipase A ₂
LH	Lipase hépatique
TG	Triglycéride
MTP	Microsomial triglyceride transfer protein
EGF	Epidermal growth factor
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
LXR	Liver X receptor
ABC	ATP-binding cassette
TMD	Domaine transmembranaire
NBD	Domaines de liaison

ATP	Adénosine triphosphate
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
P₂Y₁₃	Purinergic receptor P ₂ Y, G-protein coupled 13
ecto-ATPase	ecto-adenosine triphosphatase
NPC1L1	Niemann-pick C1-like 1
AVC	Accidents vasculaires cérébraux
AOMI	Artérite oblitérante des membres inférieurs
AHA	American heart association
MNT	Maladies non transmissibles
MT	Maladies transmissibles
HTA	Hypertension artérielle
PAS	Pression artérielle systolique
PAD	Pression artérielle diastoliques
CE	Cellules endothéliales
NO	Oxyde nitrique
LEI	Limitante élastique interne
CML	Cellules musculaires lisses
MEC	Matrice extracellulaire
LEE	Limitante élastique externe
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ROS	Reactive oxygen species
ET1	Endothéline 1
ICC	Insuffisance cardiaque congestive
NOS	Oxyde nitrique synthase
GMP	Guanosine monophosphate

Table des illustrations

Figures

Figure 1: Répartition des principales causes de décès dans le monde (OMS)	8
Figure 2: Schéma présentant l'aorte et ses constituants	11
Figure 3: Structure des vaisseaux sanguins	13
Figure 4: Présentation originale des différents stades de l'athérosclérose selon Stary	13
Figure 5: Phase d'initiation de l'oxydation lipidique	17
Figure 6: Étapes de propagation de l'oxydation lipidique	18
Figure 7: Recrutement des monocytes circulants au niveau de l'espace sous-endothélial	20
Figure 8: Les étapes de la formation et de la rupture de la plaque athéromateuse	22
Figure 9: Structure chimique de la molécule d'aspirine	24
Figure 10: Structures chimiques du ticlopidine, du clopidogrel, du pasugrel et du ticagrelor	25
Figure 11: Structure chimique du cilostazol	25
Figure 12: Structures chimiques de l'atorvastatine et de la simvastatine	26
Figure 13: Voie de biosynthèse des composés phénoliques	29
Figure 14: Acide cinnamique et acide benzoïque	30
Figure 15: Structure de base des flavonoïdes.	32
Figure 16: Fruits, fleurs et arbre du grenadier « Sefri » de la région d'Ouled Abdellah	40
Figure 17: Arbre, fleurs et fruits du grenadier « Sefri » d'Ouled Abdellah.....	55
Figure 18: Les étapes de la préparation des échantillons du grenadier.....	56
Figure 19: Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH).....	65
Figure 20: Mécanisme réactionnel intervenant entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).....	67
Figure 21: Principe de formation des produits de la peroxydation lipidique (TBARS)	70
Figure 22: Rendements en écorces, arilles, jus et en pépins	87
Figure 23: Rendements des extractions (en %)......	88
Figure 24: Tracé chromatographique de principales molécules bioactives	91
Figure 25: Présentation de la composition en minéraux.....	94
Figure 26: Teneurs en protéines totales des extraits phénoliques du grenadier	95
Figure 27: Teneurs en polyphénols totaux des extraits phénoliques du grenadier	96
Figure 28: Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits phénoliques du grenadier	97
Figure 29: Teneurs en flavonols totaux des extraits phénoliques du grenadier.....	98
Figure 30: Teneur en tanins condensés (A) et hydrolysables (B)	99
Figure 31: Teneur en anthocyanosides totaux des extraits phénoliques.	100
Figure 32: Teneurs en proanthocyanidines des extraits phénoliques du grenadier	101
Figure 33: Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du grenadier (DPPH).....	102
Figure 34: Concentration inhibitrice IC ₅₀ du radical DPPH• des différents extraits du grenadier	104
Figure 35: Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du grenadier (ABTS).....	105

Figure 36: Concentration inhibitrice IC50 du radical ABTS• des différents extraits du grenadier.....	107
Figure 37: Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du grenadier (H ₂ O ₂)	108
Figure 38: Concentration inhibitrice IC50 du radical H ₂ O ₂ des différents extraits du grenadier	110
Figure 39: Évaluation des absorbances des différents extraits phénoliques de grenade dans le test de l'activité antioxydante totale.....	111
Figure 40: Activité antioxydante totale des extraits phénoliques du grenadier.....	112
Figure 41: Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe ³⁺ en TPTZ-Fe ²⁺ par les extraits de l'écorce.....	113
Figure 42: Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe ³⁺ en TPTZ-Fe ²⁺ par l'acide ascorbique.....	113
Figure 43: Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe ³⁺ en TPTZ-Fe ²⁺ par l'extrait des arilles	114
Figure 44: Pouvoir réducteur des extraits de <i>Punica granatum</i> testé par la méthode de FRAP (5 min)	114
Figure 45: Pouvoir réducteur des extraits de <i>Punica granatum</i> testé par la méthode de FRAP (30min).	115
Figure 46: Les valeurs de l'EC1 des extraits de <i>Punica granatum</i> par la méthode de FRAP.....	116
Figure 47: Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du grenadier (Béta-carotène).	117
Figure 48: Cinétique des absorbances des différents extraits phénoliques du grenadier (FTC).....	118
Figure 49: Activité antioxydante des différents extraits phénoliques du grenadier (FTC).	120
Figure 50: Activité antioxydante des différents extraits phénoliques du grenadier (TBA).....	121
Figure 51: Activité antioxydante des différents extraits phénoliques du grenadier (TBARS).	123
Figure 52: Effet des extraits phénoliques sur le profil lipidique chez le rat <i>Wistar</i>	143
Figure 53: Effet du Triton WR-1339, de la simvastatine et de la grenade sur le stress oxydatif.	144
Figure 54: Effet des extraits phénoliques de grenade sur l'évolution du poids corporel.	146
Figure 55: Effet des extraits phénoliques de grenade sur l'indice de masse corporel.	146
Figure 56: Effet des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade sur le poids corporel.	147
Figure 57: Effet des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade sur le poids des organes.	149
Figure 58: Effet des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade sur le profil lipidique.	152
Figure 59: Effet des extraits phénoliques de grenade sur l'évolution de la glycémie.....	153
Figure 60: Effet des extraits phénoliques de grenade sur la glycémie.....	153
Figure 61: Effet des extraits phénoliques de grenade sur les enzymes hépatiques (ALAT et ASAT).....	154
Figure 62: Effet des extraits phénoliques de grenade sur les lipides au niveau du foie.....	155
Figure 63: Effet des extraits phénoliques de grenade sur le stress oxydatif hépatique.....	156
Figure 64: Coupes histologiques du foie.	157
Figure 65: Coupes histologiques de l'aorte.	158
Figure 66: Effet des extraits phénoliques de la grenade sur la disparition de l'α tocophérol.....	170
Figure 67: Les polyphénols de grenade améliorent l'activité de la paroxonase (PON1).	171
Figure 68: Les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade induit l'expression de la PON1.	172
Figure 69: Activité de piégeage des radicaux intracellulaires des extraits phénoliques du grenadier.	173
Figure 70: Effets des extraits phénoliques du grenadier sur les niveaux de TBARS.	174
Figure 71: Effet de l'EAG sur l'efflux de cholestérol médié par l'apoA1.....	175
Figure 72: Effet des extraits phénoliques de la grenade et de la punicalagine sur l'efflux de cholestérol.....	176
Figure 73: Effet de l'EAG sur l'expression des transporteurs du cholestérol.....	177

Figure 74: Effet des extraits phénoliques de la grenade (EPA et EPE) et de la punicalagine sur l'expression des transporteurs ABCA1, ABCG1 et SR-B1. **178**

Tableaux

Tableau 1: Classification des composés phénoliques	29
Tableau 2: Programme (gradient d'éluion et timing).....	64
Tableau 3: Répartition et doses injectées pour chaque groupe	77
Tableau 4: Caractéristiques pomologiques du grenadier Sefri	87
Tableau 5: Résultats du criblage phytochimique des extraits du grenadier	89
Tableau 6: Compositions et concentrations phénoliques des extraits du grenadier	92
Tableau 7: Composition minérale des extraits de <i>Punica granatum</i> (mg/Kg d'extrait sec).....	92
Tableau 8: Teneur des protéines totales des extraits phénoliques du grenadier.....	95
Tableau 9: Teneur en polyphénols totaux des extraits phénoliques du grenadier	96
Tableau 10: Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits du grenadier	97
Tableau 11: Teneur en flavonols totaux des différents extraits du grenadier	98
Tableau 12: Teneur en tanins hydrolysables et condensés des extraits phénoliques.....	98
Tableau 13: Teneur en anthocyanosides des extraits phénoliques du grenadier	100
Tableau 14: Teneur en proanthocyanidines des extraits phénoliques du grenadier	101
Tableau 15: Concentration inhibitrice IC50 (µg/ml) du radical DPPH•	103
Tableau 16: Concentration inhibitrice IC50 (µg/ml) du radical ABTS•	106
Tableau 17: Concentration inhibitrice IC50 (µg/ml) du radical H ₂ O ₂	109
Tableau 18: Les valeurs de l'EC1 des extraits de grenade et de l'acide ascorbique	116
Tableau 19: Activité antioxydante des extraits de grenade par la méthode de l'acide thiobarbiturique.....	121
Tableau 20: Effet des extraits de grenade sur le poids corporel, l'IMC et les indices athérogènes.....	145

Sommaire

Introduction générale.....	1
PREMIÈRE PARTIE : CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
Chapitre I : Physiopathologie de l'Athérosclérose.....	5
1 Introduction.....	5
2 Historique.....	6
3 Épidémiologie.....	7
4 Facteurs de risques.....	9
5 Physiopathologie de l'athérosclérose.....	11
6 Complications cliniques.....	23
7 Traitements de l'athérosclérose.....	24
Chapitre II : Systèmes phénoliques antioxydants et antiathérogènes.....	28
1 Introduction.....	28
2 Classification et biosynthèse des composés phénoliques.....	28
3 Polyphénols monomériques.....	30
4 Polyphénols sous forme de polymère.....	32
5 Composés phénoliques et activité antioxydante.....	33
7 Polyphénols et athérosclérose.....	35
8 <i>Punica granatum</i> L. (espèce étudiée).....	38
9 Caractérisation phytochimique du grenadier.....	40
10 Rôle de la grenade dans la nutrition et la santé humaine.....	42
DEUXIÈME PARTIE : DÉMARCHE SCIENTIFIQUE.....	48
TROISIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	54
1 Réactifs et produits chimiques.....	55
2 Matériel végétal étudié.....	55
3 Critères pomologiques des fruits de grenadier.....	56
4 Préparation des échantillons pour analyse.....	56
5 Caractérisation chimique des extraits.....	57
6 Étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques du grenadier.....	65

7 Effet des extraits phénoliques sur l'oxydation des LDL.....	71
8 Marqueurs biochimiques de la peroxydation lipidique.....	71
9 Mesure de l'activité et l'expression de la paraoxonase 1.....	72
10 Culture cellulaire et conditions de traitement pour l'activité antioxydante.....	72
11 Effet des extraits phénoliques de grenade sur l'efflux de cholestérol.....	73
12 Étude <i>in vivo</i>	74
13 Données et analyses statistiques.....	83
QUATRIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	84
Chapitre I : Caractérisation pomologique, phytochimique et biochimique de la grenade « Sefri ».....	85
1 Introduction.....	85
2 Résultats.....	87
3 Discussion.....	123
4 Conclusion et perspective.....	139
Chapitre II : Évaluation de l'effet hypocholestérolémiant des extraits phénoliques de la grenade « Sefri » chez des rats <i>Wistar</i> soumis à un régime hypercalorique.....	140
1 Introduction.....	140
2 Résultats.....	142
3 Discussion.....	159
4 Conclusion et perspective.....	167
Chapitre III : Activité antioxydane des extraits phénoliques de la grenade Sefri (<i>Punica granatum</i> L.) riches en punicalagine sur le processus oxydatif et le transport inverse du cholestérol.....	168
1 Introduction.....	168
2 Résultats.....	170
3 Discussion.....	178
4 Conclusion et perspectives.....	184
Conclusion générale et perspectives.....	186
Références bibliographiques.....	188
ANNEXES.....	223

Résumé

Les maladies cardiovasculaires représentent actuellement la principale cause de décès dans le monde, au premier rang desquelles figurent les cardiopathies coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux. Ils sont, dans la plupart des cas la traduction clinique de la maladie d'athérosclérose. L'accumulation du cholestérol dans les macrophages peut résulter d'une augmentation de l'absorption des LDL et/ou d'une diminution de la concentration de HDL, le médiateur de l'efflux du cholestérol au niveau des tissus périphériques. Plusieurs études ont montré que la grenade (*Punica granatum* L.) peut réduire plusieurs facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. Notre étude consiste en la valorisation des produits de grenadier, et plus particulièrement la variété « Sefri » de la région de Béni Mellal-Khénifra.

Objectifs : sont d'élucider le rôle athéroprotectif des différents extraits du grenadier via l'évaluation du pouvoir antioxydant, hypolipémiant et principalement la promotion du processus du transport inverse du cholestérol *in vitro* et *in vivo*. Le premier volet de notre étude à porter sur la caractérisation des composés phénoliques par HPLC et l'étude de l'activité hypolipémiante et anti-athérosclérotique du grenadier chez le rat rendu hypercholestérolémique sous l'effet d'un régime hypercalorique et hypercholestérolémique (RHCC). Cet effet a été évalué moyennant un suivi de l'évolution des paramètres lipidiques et histologiques. Le deuxième volet de notre étude a été développé dans le but d'apporter des explications mécanistiques et moléculaires à l'effet hypolipémiant. Ainsi, des travaux sur les mécanismes d'activités antioxydantes ont été menées *in vitro* et sur un modèle de cellules humaines cancéreuses de la prostate (J82) et sur les LDLs humaines. Un troisième volet a été consacré à l'étude moléculaire des extraits de grenadier et de la punicalagine sur la voie du transport inverse du cholestérol (TIC) au niveau des macrophages (J774). Pour ce faire, une étude sur l'efflux du cholestérol a été réalisée et argumentée par l'évaluation de l'activité de la paraoxonase 1 et l'expression de ses transporteurs qui régissent ce processus TIC (ABCA1, ABCG1, LXR et SR-B1) moyennant la technique du western blot.

Résultats : Nos résultats ont montré une amélioration du profil lipidique et glycémique chez les groupes de rats traités par les extraits de la grenade Sefri ainsi qu'une réduction des dépôts lipidiques au niveau des organes. L'analyse phyto-chimique par HPLC des extraits du grenadier (la pelure et les arilles) a montré une richesse de ces extraits en α et β punicalagine. Ces extraits ont révélés une activité antioxydante puissante liée à la réduction du piégeage des radicaux libres et de la réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, ces extraits ont exercé un effet préventif contre l'oxydation des LDLs et la formation des TBARS

ainsi que l'augmentation du pouvoir de piégeage des radicaux libres intracellulaires au niveau des cellules cancéreuses (J82). Fait marquant, ces extraits phénoliques ont augmenté l'efflux du cholestérol, l'expression des transporteurs du cholestérol, surtout l'ABCA1 au niveau des macrophages J774 ainsi que de l'activité paraoxonase 1.

Conclusion : Nos résultats montrent l'importance de la grenade « Sefri » dans la régulation des fonctions antiathérogènes, et plus particulièrement, en présence des facteurs de risques pour les maladies cardiovasculaires, tel que l'hypercholestérolémie et le stress oxydant. Ces résultats laissent suggérer la grenade (variété de Sefri), comme source d'antioxydants polyphénoliques naturels, possèdent un effet protecteur et préventif contre le développement de l'athérosclérose, et par conséquent contribuent à la réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires.

Mots-clés : *Punica granatum* L. (Sefri), activité antioxydante, athérosclérose, LDL, HDL, PON1, stress oxydant, composés phénoliques, transport inverse du cholestérol, ABCA1, ABCG1, SR-B1, LXR, et Paraoxonase 1.

Abstract

Cardiovascular disease (CVD) is currently the leading cause of death worldwide, led by coronary heart disease and stroke. They are, in many cases, the clinical translation of atherosclerotic disease. Cholesterol accumulation in macrophages can result from an increase in LDL absorption and a decrease in the concentration of HDL, which mediates the efflux of cholesterol. Several studies have shown that pomegranate (*Punica granatum* L.) can reduce several risk factors for cardiovascular disease. Our study focuses on the valorization of by-products bioactive from the pomegranate, particularly a variety of Sefri from the Beni Mellal-Khenifra region.

Objectives: Our objective was to elucidate the atheroprotective effect of different extracts from pomegranate fruit via evaluation of the antioxidant and hypolipidemic activity and mainly the promotion of reverse cholesterol transport process *in vitro* and *in vivo*. The principal objective of this first part of our study was to evaluate the phenolic profile of pomegranate phenolic extracts by HPLC, the hypolipidemic, and the antiatherosclerotic activities in high-fat diet-induced hypercholesterolemic rats. This effect was evaluated by monitoring the evolution of lipid and histological parameters. Secondly, our objective was to provide molecular explanations for the hypolipidemic effect. Thus, work on the mechanisms of antioxidant activities was carried out *in vitro* and on human prostate cancer cell models (J82) and human LDL. A third component was devoted to the molecular study of pomegranate extracts and punicalagin on the reverse cholesterol transport (RCT) pathway in macrophages (J774). For this purpose, the cholesterol efflux was carried out and argued by evaluating the paraoxonase (PON1) activity and the expression of its transporters that regulate this process of the RCT (ABCA1, ABCG1, LXR, and SR-B1) using the western blot technique.

Results: Our results showed an amelioration of lipid and glycemic levels in the groups of rats treated with the pomegranate extracts and the lipidic deposits of the organs. Phytochemical analysis by HPLC of pomegranate extracts (peels and arils) showed a richness of these extracts in α and β punicalagin. These extracts showed strong antioxidant effects related to decreased free radical scavenging and reactive oxygen species (ROS) reduction. In addition, these extracts exerted preventive effects against LDL oxidation and TBARS formation and increased intracellular free radical scavenging capacity in cancer cells (J82). Interestingly,

these phenolic extracts increased cholesterol efflux, the expression of cholesterol transporters, especially ABCA1 in J774 macrophages, and paraoxonase (PON1) activity.

Conclusion: Our results show the importance of pomegranate (Sefri) in the regulation of antiatherogenic functions, and more particularly, in the presence of risk factors for cardiovascular diseases, such as hypercholesterolemia and oxidative stress. These results suggest that pomegranate (Sefri variety), as a source of natural polyphenolic antioxidants, has a protective and preventive effect against the development of atherosclerosis, and therefore contributes to decreasing the incidence of cardiovascular diseases.

Keywords: *Punica granatum* L. (Sefri), antioxidant activity, atherosclerosis, LDL, HDL, PON1, oxidative stress, phenolic compounds, reverse cholesterol transport, ABCA1, ABCG1, SR-B1, LXR, and Paraoxonase 1.

ملخص

تعد أمراض القلب والأوعية الدموية حاليًا السبب الرئيسي للوفيات في العالم ، وأولها أمراض القلب التاجية والسكتة الدماغية. في معظم الحالات، تعتبر هذه الأمراض أحد أنواع أمراض تصلب الشرايين . قد ينتج تراكم الكوليسترول في البلمعات عن زيادة امتصاص LDL و / أو انخفاض تركيز HDL ، وهو وسيط تدفق الكوليسترول إلى الأنسجة المحيطة. أظهرت العديد من الدراسات أن نبتة الرمان (*Punica granatum L.*) يمكن أن تقلل من العديد من عوامل الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية. تتجلى دراستنا في تقييم منتجات الرمان ، و تحديدًا صنف "الصفري" من منطقة بني ملال خنيفرة.

الأهداف: توضيح الدور الوقائي لمستخلصات الرمان المختلفة من خلال تقييم مضادات الأكسدة وقوة خفض الدهون وبشكل رئيسي تعزيز عملية نقل الكوليسترول العكسي في المختبر وفي الجسم الحي. ركز الجزء الأول من دراستنا على تحديد المركبات الفينولية بواسطة تقنية HPLC ودراسة نشاط خفض دهون الدم ومضادات التصلب بواسطة مستخلصات الرمان في الفئران التي تعرضت إلى فرط كوليسترول الدم تحت تأثير نظام غذائي غني بالسكريات الحرارية و الكوليسترول (RHCC). تم تقييم هذا التأثير من خلال مراقبة التغيرات في المعلمات الذهنية والنسجية. تم تطوير الجزء الثاني من دراستنا بهدف تقديم تفسيرات ميكانيكية وجزيئية لتأثير خفض الدهون. وهكذا ، تم العمل على آليات الأنشطة المضادة للأكسدة في المختبر وعلى نماذج خلايا سرطان البروستاتا البشرية (J82) وعلى جزيئات LDL البشرية. تم تخصيص جزء ثالث للدراسة الجزيئية لمستخلصات الرمان ومادة Punicalagin ودورها في مسار نقل الكوليسترول العكسي في الخلايا (J774). للقيام بذلك ، تم إجراء دراسة حول تدفق الكوليسترول وذلك من خلال تقييم نشاط باروكسوناز 1 والتعبير عن ناقلاتها التي تتحكم في هذه العملية (ABCA1 ، ABCG1 ، LXR و SR-B1) باستخدام تقنية الويسترن بلوت.

النتائج: أظهرت نتائجنا انخفاضًا في مستوى الدهون ونسبة السكر في الدم في مجموعات الفئران المعالجة بمستخلصات الرمان وكذلك انخفاض في ترسبات الدهون على مستوى الأعضاء. أظهر التحليل الكيميائي بواسطة تقنية HPLC لمستخلصات الرمان (القشر و البذور) أن هذه المستخلصات كانت غنية بمادة البيينيكالين. ثبت أن هذه المستخلصات لها نشاط قوي مضاد للأكسدة يتعلق بالحد من إزالة الجذور الحرة وتقليل أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS). بالإضافة إلى ذلك، تمارس هذه المستخلصات تأثيرًا وقائيًا ضد أكسدة جزيئات LDLs وتشكل المواد التفاعلية لحمض الثيوباربيتوريك (TBARS) بالإضافة إلى زيادة قوة محاربة الجذور الحرة داخل الخلايا السرطانية (J82). بشكل ملحوظ ، زادت هذه المستخلصات الفينولية من تدفق الكوليسترول ، والتعبير عن ناقلات الكوليسترول ، وخاصة ABCA1 في الخلايا J774 بالإضافة إلى نشاط باروكسوناز 1.

الخلاصة: أظهرت نتائجنا أهمية الرمان الصفري في تنظيم الوظائف المضادة لتصلب الشرايين ، وبشكل أكثر تحديدًا في خفض عوامل الخطر المسببة لأمراض القلب والأوعية الدموية ، مثل ارتفاع نسبة الكوليسترول والضغط التأكسدي. تشير هذه النتائج إلى أن الرمان (صنف الصفري) ، يعتبر مصدر طبيعي لمضادات الأكسدة البوليفينولية ، كما ان له تأثير وقائي ضد الإصابة بتصلب الشرايين ، وبالتالي يساعد في التقليل من الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum L.* (صنف الصفري) ، نشاط مضادات الأكسدة ، تصلب الشرايين ، LDL ، HDL ، PON1 ، الإجهاد التأكسدي ، المركبات الفينولية ، نقل الكوليسترول العكسي ، ABCA1 ، ABCG1 ، SR- B1 و LXR ، و باروكسوناز 1.

Introduction générale

Introduction générale

Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent actuellement la principale cause de décès dans le monde, au premier rang desquelles figurent les cardiopathies coronariennes (infarctus du myocarde), et les maladies cérébro-vasculaires (accidents vasculaires cérébraux) (Global Health Estimation, OMS 2011). On estime, selon les prévisions de l'OMS, que les mortalités au niveau mondial associées aux MCV atteindront près de 23,6 millions par année et constitueront de ce fait les premières causes de mortalité (Global Health Estimation, OMS 2018).

Au Maroc, les maladies cardiovasculaires représentent aussi la principale cause de décès. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 40% de mortalité dans le royaume seraient dus aux MCV. Ils sont, dans la plupart des cas, la traduction clinique de la maladie d'athérosclérose, qui se caractérise par des épisodes de rupture ou d'érosion de la plaque athéromateuse (Babaniamansour et al., 2020). Ceci tient aux multiples facteurs environnementaux tels une alimentation déséquilibrée, le tabagisme, la sédentarité, mais également d'une augmentation assez importante de la prévalence du diabète de type II, de l'obésité sévère, la dyslipidémie et du syndrome métabolique en général (Lechner et al., 2020; Libby et al., 2019).

Comme l'indique son étymologie grecque, *athêroma* qui signifie « bouillie » en relation avec le cœur nécrotico-lipidique de la plaque et *sclérosis* qui veut dire « durcissement » en relation avec la calcification de la matrice extracellulaire. L'athérosclérose se caractérise par la formation d'une plaque athéromateuse (Kowara & Cudnoch-Jedrzejewska, 2021), contenant des lipides recouverts d'une cape d'éléments fibreux riche en collagène, en plaquettes et en cellules immunitaires ; ce qui provoque une obstruction progressive des artères empêchant ainsi l'irrigation des organes (Aguilar-Ballester et al., 2020; Libby et al., 2019). C'est une pathologie inflammatoire chronique qui affecte les artères élastiques et les artères musculaires de calibre élevé (Minelli et al., 2020), qui est à l'origine de la plupart des syndromes coronariens aigus (angor instable, et infarctus du myocarde), des anévrismes de l'aorte abdominale, ou encore d'artériopathie oblitérante qui touche le plus souvent les membres inférieurs (Libby et al., 2019; Wolf & Hunziker, 2020).

Malgré l'avancée de nouvelles molécules thérapeutiques, l'athérosclérose et ses complications constituent une grande problématique dans la prise en charge thérapeutique des

patients et la réussite du traitement serait d'un intérêt capital. Les médicaments modernes, y compris les statines (inhibiteurs de la HMG-CoA réductase), ont démontré leur efficacité dans le traitement de l'hypercholestérolémie pour la prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires (Singh et al., 2020). Cependant, en raison du développement de myopathies (Tomaszewski et al., 2011; Tournadre, 2019), les statines sont associées à un abondant et à une discontinuité du traitement de la part des patients (Ward et al., 2019). Les statines présentent aussi d'autres effets secondaires (hépatotoxicité, troubles gastro-intestinaux, toxicité rénale, diabète type 2, ...) (Bitzur et al., 2013; Karahalil et al., 2017; Saha & Garg, 2021), ce qui justifie la recherche d'autres alternatives médicinales (Tournadre, 2019).

Ces dernières années, un intérêt particulier a été porté sur la valorisation de la médecine traditionnelle et alternative, non seulement pour la conservation des traditions et de la biodiversité culturelle mais surtout pour le développement de nouvelles molécules d'origine naturelle avec moins d'effets indésirables (Salmerón-Manzano et al., 2020). L'Organisation Mondiale de la Santé souligne que près de 80% de la population, dans les pays Asiatiques et Africains, dépend de la médecine traditionnelle, dont les traitements sont à base des plantes, pour des soins préventifs. La recherche sur les plantes médicinales est extrêmement orientée vers l'utilisation des produits naturels dans le traitement préventif de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Chang et al., 2020; Kirichenko et al., 2020). Les données ethnobotaniques disponibles montrent qu'il y a plusieurs espèces végétales médicinales montrant une activité hypolipémiante (Asija & Singh, 2016). Bien que la plupart de ces espèces végétales possèdent une grande réputation dans la médecine traditionnelle, malheureusement, certaines d'entre elles n'ont pas encore été exploitées dans le domaine de la recherche scientifique. Des études scientifiques des remèdes naturels à base de plantes pour le traitement de l'athérosclérose peuvent être un levier de prévention efficace (Kirichenko et al., 2020).

Les plantes médicinales sont une excellente source de molécules naturelles qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques. Les polyphénols sont des composants naturels, qui suscitent actuellement un grand intérêt nutritionnel et thérapeutique (Di Pietro et al., 2020; Leri et al., 2020; Luo et al., 2021; Monsalve et al., 2017; Restani, 2020). Les recherches ethnobotaniques mondiales font état d'un certain nombre de plantes médicinales, de fruits et de légumes riches en composés phénoliques qui peuvent être utilisés pour la prise en charge des dyslipidémies et la prévention des complications cardiovasculaires associées.

En matière de progrès thérapeutiques, notre travail se propose dans le but de valoriser une flore locale utilisée en médecine traditionnelle. C'est dans cette optique que l'écorce et les arilles de *Punica granatum* L. (variété de Sefri) ont été étudiés. Cette plante est largement utilisée au Maroc dans le traitement de problèmes digestifs, et des ulcérations des muqueuses buccales. Notre travail a pour objectif de tester l'effet anti-hyperlipémique des extraits riches en composés phénoliques du fruit de *Punica granatum* L. Des études *in vitro* et *in vivo* visant à étudier leur capacité à empêcher le processus athérogène, à diminuer les effets cytotoxiques et inflammatoires, ainsi que la promotion du transport inverse du cholestérol ont été réalisées. Nous avons testé les activités antioxydantes et hypolipémiantes de la plante par la réalisation d'une série d'essais effectués chez des rats *Wistar* rendus hypercholestérolémiques par un régime hypercalorique riche en cholestérol (RHHC), capable d'augmenter le statut inflammatoire et la formation des plaques d'athérosclérose, comme modèle de l'hypercholestérolémie expérimentale.

PREMIÈRE PARTIE :
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Physiopathologie de l'Athérosclérose

1 Introduction

L'athérosclérose est une pathologie d'origine multifactorielle, qui touche principalement les artères de gros et moyens calibres (Alfarisi et al., 2020; Cismaru et al., 2021; Mäkinen et al., 2020). Elle se développe lentement tout au long de la vie d'une manière silencieuse au stade du fœtus jusqu'à une obstruction brutale d'une artère coronaire apparaît à l'âge adulte. Elle se manifeste par des accidents cliniques dont elle est la cause sous-jacente (maladies coronariennes, infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux) (Alfarisi et al., 2020; Libby et al., 2019; Mäkinen et al., 2020). L'athérosclérose est un processus dégénératif (Minelli et al., 2020) chronique et évolutif qui fait intervenir des phénomènes oxydatifs, inflammatoires, et cytotoxiques (Kocyigit et al., 2020; Schäfer & Zerneck, 2020; Yang et al., 2017). En 1954, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a donné une définition descriptive, mais toujours d'actualité : « L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le tout s'accompagne d'une modification de la média ».

L'athérosclérose est le principal facteur responsable d'affections aiguës, ils dépendent de l'endroit où se forme la plaque d'athérome (Bouguerne, 2012):

- Les infarctus du myocarde dus à l'installation de la plaque d'athérome dans les artères coronaires.
- Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) dus à la formation de la plaque athéromateuse au niveau des artères encéphalique.
- Une artérite oblitérante des membres inférieurs (AOMI).
- Les ischémies aiguës causées par la formation de la plaque au niveau des membres inférieurs.

Sur le plan histologique, une classification détaillée des stades successifs de l'apparition de la plaque d'athérome (où l'on dénombre 6 à 8 stades) a été élaborée par Herbert Stary en 1992 et approuvée par l'AHA (American Heart Association) en 1994 (Stary et al., 1995). La description anatomo-pathologique de l'athérosclérose retient trois stades principaux :

- La strie lipidique,
- La lésion fibrolipidique
- et finalement la lésion avancée (Ross, 1995).

Dès le début du XIX^e siècle, les travaux d'Anitschkow et Chalutow (Anitschkow & Chalutow, 1983) avaient permis de mettre en évidence le rôle du cholestérol dans l'athérosclérose expérimentale chez le lapin. Ces résultats ont donné naissance à l'« **hypothèse lipidique** », selon laquelle le cholestérol serait le facteur de risque majeur déclenchant la formation de la plaque et le développement de l'athérosclérose (Aguilar-Ballester et al., 2020). L'altération du métabolisme du cholestérol conduit à la dyslipidémie et à l'athérosclérose prématurée, un processus modulé par l'immunité innée et adaptative (Moroni et al., 2019; Tabas & Lichtman, 2017; Xu et al., 2019). Un événement important précédant la formation des lésions athérosclérotiques est l'accumulation de lipoprotéines contenant de l'ApoB, principalement des LDL, dans l'espace sous endothélial (Chistiakov et al., 2019; Tabas & Lichtman, 2017). Ces lipoprotéines sont susceptibles d'être modifiées par oxydation, acétylation et agrégation, ce qui stimule leurs actions pro-inflammatoires (Bäck et al., 2019). D'autre part, le dysfonctionnement endothélial est un facteur majeur de la rétention des lipoprotéines, plus particulièrement dans les régions du lit vasculaire soumises à une force de cisaillement élevée, ainsi que dans plusieurs conditions telles que le vieillissement, l'inflammation ou le stress oxydatif produit par d'autres conditions pathologiques comme l'hypertension ou le diabète (Bäck et al., 2019; Flynn et al., 2019; Weber & Noels, 2011).

Le développement et la progression de l'athérosclérose étant associés à une augmentation de la concentration plasmatique du cholestérol LDL, le traitement actuel de cette maladie fait appel aux médicaments hypolipémiants à savoir les statines. Cependant, les statines ne permettent pas d'atténuer la maladie mais tout au plus ralentissent son développement et sa progression. Cependant, en raison du développement de myopathies (Tomaszewski et al., 2011; Tournadre, 2019), ces statines sont associées à un abandon et à une discontinuité du traitement de la part des patients (Ward et al., 2019). Les statines présentent aussi d'autres effets secondaires (hépatotoxicité, troubles gastro-intestinaux, toxicité rénale, diabète type 2, ...) (Bitzur et al., 2013; Karahalil et al., 2017; Saha & Garg, 2021), ce qui justifie la recherche d'autres alternatives médicinales (Tournadre, 2019). Nous présentons, dans ce chapitre une description des événements cellulaires et moléculaires clés dans l'apparition de la pathologie d'athérosclérose.

2 Historique

Sur le plan anatomopathologique, c'est en 1740 que le médecin allemand KRELL avait décrit pour la première fois l'athérosclérose. Il avait observé des concrétions calciques au niveau de la paroi artérielle, et il leur a donné le nom de : « plaques osseuses ». Une dizaine

d'années plus tard, en 1755, le terme « athérome » fut donné à la plaque sténosante par Albrecht Von Haller (Schwartz. & Mitchell, 1962), en raison de sa ressemblance avec un kyste rempli de matière grasseuse ou un abcès rempli de matière pultacée; mais elle n'a été baptisée qu'en 1904 par Felix Marchand qui utilisa le terme « atherosklerose ». Le mot choisi est précis car beaucoup plus juste que celui d'athérome puisqu'il introduit la notion de sclérose toujours associé à la « bouillie » (*athara* en grec) athéromateuse.

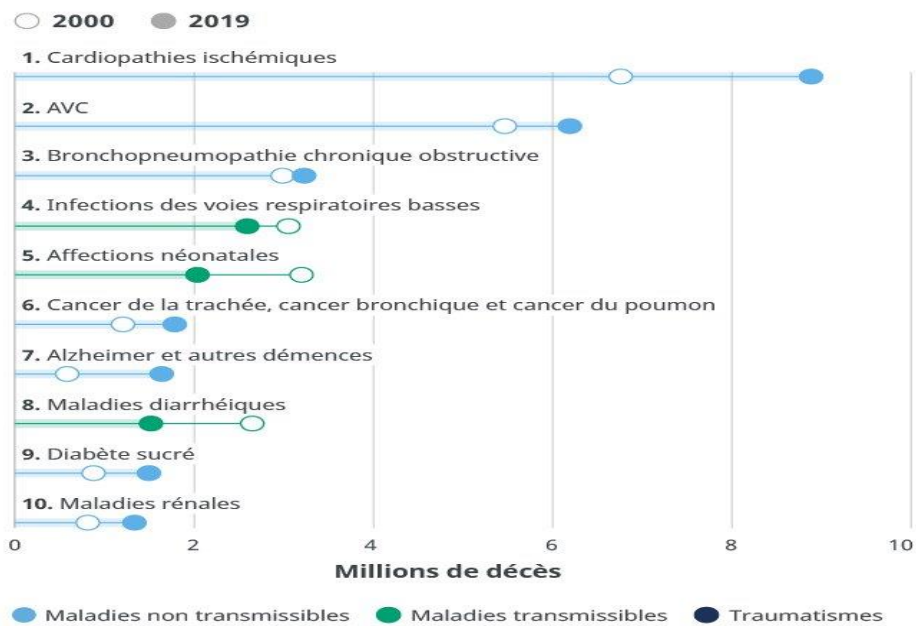
Nikolai Anichkov a été le premier à démontrer le rôle du cholestérol dans le développement de l'athérosclérose. Ses expériences classiques de 1913 ont ouvert la voie à notre compréhension actuelle du rôle du cholestérol dans les maladies cardiovasculaires. L'élucidation du rôle du cholestérol dans la pathogenèse de l'athérosclérose est souvent considérée comme l'une des plus grandes découvertes du XX^{ème} siècle.

En 1908, Ignatowski a décrit une relation entre une alimentation riche en cholestérol et l'athérosclérose expérimentale. En 1910, Adolf Windaus montre que les lésions athéromateuses contiennent 6 fois plus de cholestérol libre et 20 fois plus de cholestérol estérifié qu'une paroi artérielle normale. Puis, en 1913, Nikolai Anichkov montre que le cholestérol seul est à l'origine des modifications athéromateuses de la paroi vasculaire (Anitschkow & Chalатов, 1983).

3 Épidémiologie

On ne connaît pas précisément le nombre de personnes atteintes d'athérosclérose (Pahwa & Jialal, 2021), mais on peut évaluer ses retentissements dans la population en raison de son implication dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires sont responsables de plus de 30 % de mortalité, constituant ainsi la première cause de décès au monde (**Figure 1**). L'athérosclérose est l'une des causes principales d'infarctus du myocarde (120 000 cas par an), d'accidents vasculaires cérébraux (150 000 victimes par an), des pathologies pouvant entraîner de lourds handicaps voire le décès. Outre ces maladies, l'athérosclérose est également responsable de 90% des cas d'angine de poitrine, ou angor stable.

Les principales causes de mortalité dans le monde



Source : Estimations sanitaires mondiales de l'OMS.

Figure 1: Répartition des principales causes de décès dans le monde (OMS).

Aux États-Unis, environ 655 000 personnes meurent chaque année d'une maladie cardiaque. Cela représente un décès sur quatre (Brown et al., 2020; Virani et al., 2020). Les maladies coronariennes sont la principale cause de décès dans le monde occidental, tuant plus de 370 000 personnes par an (Pahwa & Jialal, 2021). En moyenne, environ 735 000 Américains sont victimes d'une crise cardiaque chaque année (Capurso et al., 2018; Pahwa & Jialal, 2021).

Ces dernières années, le Maroc a connu une transition épidémiologique marquée par l'évolution des maladies non transmissibles (MNT) et la diminution des maladies transmissibles (MT). Les MNT constituent, actuellement, les principales causes de mortalité au Maroc selon les derniers chiffres fournis par le ministère de la santé, dont les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité avec un pourcentage de 30 % à l'échelle nationale (Sellam & Bour, 2016).

De nombreuses études épidémiologiques menées en Amérique du Nord et en Europe ont reconnu de nombreux facteurs de risque pour le développement et la progression de l'athérosclérose (Pahwa & Jialal, 2021). Ils peuvent favoriser l'athérosclérose par leurs effets sur les particules de lipoprotéines de basse densité (LDL) et l'inflammation (Pahwa & Jialal, 2021).

4 Facteurs de risques

4.1 Facteurs de risque non-modifiables

Le principal facteur de risque non-modifiable associé à l'athérosclérose est **l'âge**. En effet, l'athérogenèse débute dès l'enfance, alors que les manifestations cliniques n'apparaîtront qu'à l'âge adulte. **L'âge** est considéré comme facteur de risque puisque la rupture de la plaque d'athérome augmente après 60 ans pour les femmes et après 50 ans pour les hommes (Piepoli et al., 2016). Le deuxième facteur de risque non-modifiable lié à l'athérosclérose est **le sexe**. Les hommes sont plus touchés que les femmes par l'athérosclérose. Le rôle protecteur de l'œstradiol (hormone féminine de la classe des œstrogènes) sur le profil lipidique, la sensibilité à l'insuline ainsi que sur l'hypertension artérielle et les maladies cardiovasculaire (da Silva et al., 2021; De Paoli et al., 2021; Gregersen et al., 2019; Ndzie et al., 2021) explique cette observation. Cependant, cette protection naturelle diminue entre 10 et 15 ans après la ménopause et le risque de maladies cardiovasculaires chez les femmes rejoint celui des hommes, ce qui explique que l'apparition de l'athérosclérose dans les deux sexes s'égalise après 65 ans (Benjamin et al., 2018) et le taux de mortalité après 75 ans. Finalement, le dernier facteur de risque non-modifiable associé à l'athérosclérose est **l'hérédité et facteurs prédisposant**. Si un (ou plusieurs) parents au premier degré a subi un événement cardiovasculaire, le risque de développer une maladie cardiovasculaire sera plus grand. Ainsi, le risque de développer l'athérosclérose augmente d'autant plus si l'évènement est survenu avant 55 ans chez le père ou avant 65 ans chez la mère (Piepoli et al., 2016).

4.2 Facteurs de risque modifiables

Les facteurs de risque modifiables de l'athérosclérose sont multiples et agissent de manière synergique. Tout d'abord, **le tabagisme**, qu'il soit actif ou passif, est un facteur de risque majeur qui provoque une augmentation des lésions athéromateuses, favorisant ainsi la synthèse et le développement des plaques d'athérome. Le monoxyde de carbone et les substances toxiques contenu dans la cigarette provoque une augmentation de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), du fibrinogène, et d'adrénaline (Mury, 2018). Ainsi, les données épidémiologiques ont montrés que le tabagisme augmente par 4,7 la mortalité coronaire chez les femmes et par 3,6 fois chez les hommes (Piepoli et al., 2016). Le deuxième facteur de risque cardiovasculaire est **l'hypertension artérielle (HTA)** qui désigne une élévation de la pression artérielle systolique (PAS) et/ou diastolique (PAD). Les données épidémiologiques montre une forte corrélation entre l'hypertension (PAS > 115mmHg) et le

risque cardiovasculaire (Fuchs & Whelton, 2020; Malik et al., 2021). Il a été démontré que l'HTA est responsable de la rigidité des artères élastiques (Laurent & Boutouyrie, 2020) et participe au dysfonctionnement endothélial (Konukoglu & Uzun, 2016; Poredos et al., 2021), à l'accumulation de lipides dans l'intima (Chistiakov et al., 2015; Liu et al., 2011; Wang et al., 2014) et à la mobilisation des cellules musculaires lisses (Belo et al., 2016). **Le diabète** est considéré comme l'un des principaux facteurs aggravant le risque athérogène (Galicía-García et al., 2020; Hap et al., 2021; Poznyak et al., 2020). Cette maladie touche environ 3% de la population et représente les premières causes des néphropathies, rétinopathies, neuropathies diabétiques, et d'amputation, et double le risque d'apparition d'accidents vasculaires cérébraux, de coronaropathie et de maladies cardiovasculaires (Galicía-García et al., 2020; Ohiagu et al., 2021; Piepoli et al., 2016). Ensuite, les **dyslipidémies** jouent un rôle majeur dans l'apparition de l'athérosclérose (Lorenzatti & Toth, 2020; Rojas et al., 2017). Le risque athérogène est lié, notamment à une augmentation de la teneur en lipoprotéines de basse densité (LDL) (Woo et al., 2021; Zhao et al., 2021), une augmentation du taux de triglycérides (Sasc et al., 2021; Woo et al., 2021; Zhao et al., 2021) et une diminution de lipoprotéines de haute densité (HDL) (Woo et al., 2021). Les taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol sont corrélés au risque cardiovasculaire (Zhao et al., 2021), plus ces taux sont élevés, plus le risque de développer une maladie cardiovasculaire est important. **L'obésité** possède aussi un effet majeur dans l'apparition de l'athérosclérose (Powell-Wiley et al., 2021). Il désigne une augmentation du taux des tissus adipeux. Il est important de différencier entre l'obésité gynoïde (fesses et cuisses) et l'obésité androïde (abdominaux). C'est l'obésité au niveau abdominal qui intervient dans l'incidence de l'athérosclérose, en provoquant une augmentation de la résistance à l'insuline, une diminution de la concentration de HDL-Cholestérol, une augmentation du taux de triglycérides, une dysfonction endothéliale, une HTA et une stimulation du processus inflammatoire (Piepoli et al., 2016; Powell-Wiley et al., 2021). Finalement, **la sédentarité** est aussi un facteur de risque modifiable dont l'importance augmente depuis des années. Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques ont montrées une corrélation entre le risque de mortalité cardiovasculaire et le manque d'activité physique régulière (Biswas et al., 2015; Katzmarzyk et al., 2020; Perez-Lasierra et al., 2021).

5 Physiopathologie de l'athérosclérose

5.1 Physiologie de la paroi artérielle saine

5.1.1 Aorte

L'aorte constitue le plus gros vaisseau du corps humain avec un diamètre moyen de 3 cm au niveau de l'aorte ascendante (**Figure 2**) (Boutin et al., 2015; Shahoud et al., 2020; Tran et al., 2020). L'aorte est l'artère d'origine de toutes les artères de l'organisme, sauf l'artère pulmonaire, elle naît du ventricule gauche à partir de la valve aortique (**Figure 2**) pour s'étendre jusqu'à l'abdomen, en donnant naissance à deux petites artères (artères iliaques communes) (Tran et al., 2020) alimentant les membres inférieurs. Elle apporte notamment le sang oxygéné à toutes les parties du corps (Shahoud et al., 2020; Tran et al., 2020). Schématiquement, l'aorte est divisée en aorte thoracique et aorte abdominale. Les pathologies ischémiques liées à l'athérosclérose touchent les artères coronaires et carotidiennes, l'aorte abdominale et ses ramifications alimentant les membres inférieurs et les reins (Alfarisi et al., 2020).

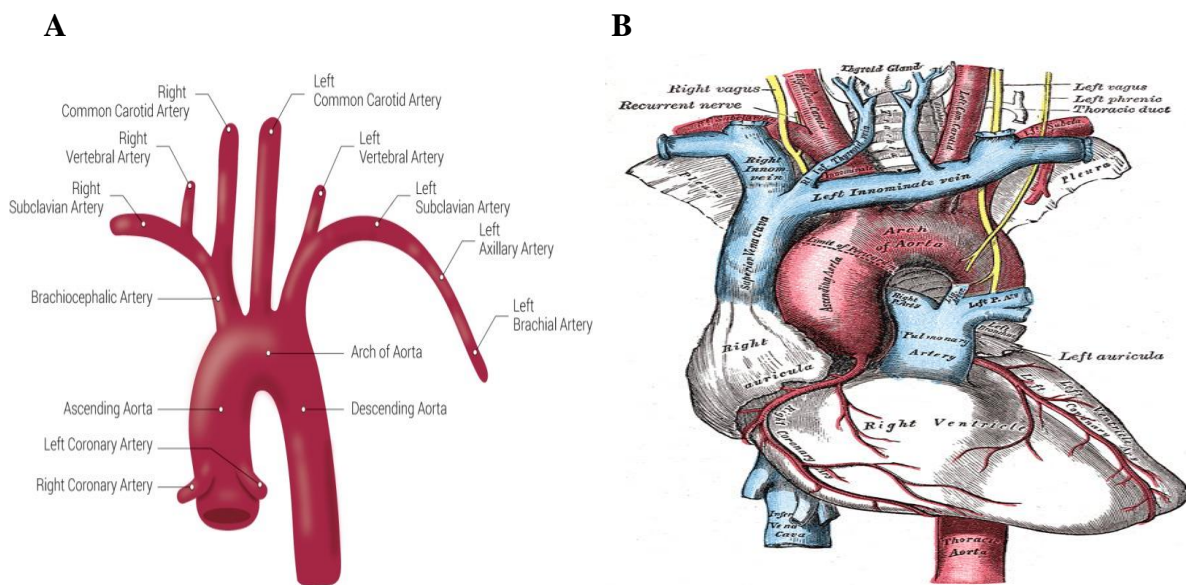


Figure 2: A. Schéma présentant l'aorte et ses constituants. B. L'arc aortique et les vaisseaux avoisinants (Shahoud et al., 2020).

5.1.2 Structure et composition des artères

Les artères sont les vaisseaux sanguins de plus grand calibre avec un diamètre moyen de 4-8 mm, ils possèdent tous une architecture de base commune. Les parois des artères sont constituées de trois tuniques concentriques morphologiquement distinctes : l'intima, la média et l'adventice comme illustré dans la **Figure 3** (Brown et al., 2017; Mercadante & Raja, 2020; Munjal & Bordoni, 2020; Taylor & Bordoni, 2020). L'**intima** est la structure la plus interne et

la plus fine de la paroi artérielle (Brown et al., 2017; Mercadante & Raja, 2020; Taylor & Bordoni, 2020). Elle est composée, de la lumière vers la média, d'un épithélium pavimenteux simple (appelé endothélium) directement en contact avec le sang ; et est munie d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) imbriquées les unes dans les autres et formant une barrière étanche et une fine couche de tissu conjonctif appelée lame basale (Brown et al., 2017). Ces cellules endothéliales assurent le rôle de filtre moléculaire permettant de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux (Brown et al., 2017), tout en autorisant l'échange sélectif de diverses substances de la circulation sanguine. Elles possèdent différentes fonctions, comme le contrôle de la vasomotricité, en sécrétant de nombreuses substances vasodilatatrices (monoxyde d'azote (NO), prostacycline, bradykinine), et vasoconstrictrices (endothéline, angiotensine, thromboxane A2) ; contrôle de la coagulation en sécrétant des antiagrégants (prostacycline), ainsi qu'une activité métabolique. L'intima est séparée de la média par la limitante élastique interne (LEI), une mince couche de tissus conjonctifs fibro-élastiques (Munjal & Bordoni, 2020). Au centre de l'artère, nous retrouvons **la média** (Munjal & Bordoni, 2020), qui est la partie la plus épaisse et le constituant principal de la paroi vasculaire. Elle contient exclusivement des cellules musculaires lisses (CML) agencées de façon concentrique appelées unités lamellaires et une matrice extracellulaire (MEC) constituée majoritairement de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de muco-polysaccharides (Brown et al., 2017). Les cellules musculaires lisses de la média sont responsables de la fonction vasomotrice et la fonction d'amortissement qui sont en rapport avec les propriétés élastiques de la matrice extracellulaire. Elles produisent des cytokines dont les médiateurs pro-inflammatoires qui sont de grande importance dans les processus physiopathologiques de développement de la plaque d'athérome. La média est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe (LEE) (Munjal & Bordoni, 2020). La dernière couche de l'artère est **l'adventice** qui est la partie la plus externe de la paroi. C'est un tissu conjonctif constitué de collagène, de fibres élastiques, fibroblastes et adipocytes. Il est vascularisé par des capillaires (vasa-vasorum) et innervé (nervo-vasorum) (Taylor & Bordoni, 2020). L'adventice est parcouru par ce système capillaire qui apporte les nutriments aux cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau. L'adventice permet par ailleurs la fixation des vaisseaux aux tissus de voisinage (Mercadante & Raja, 2020).

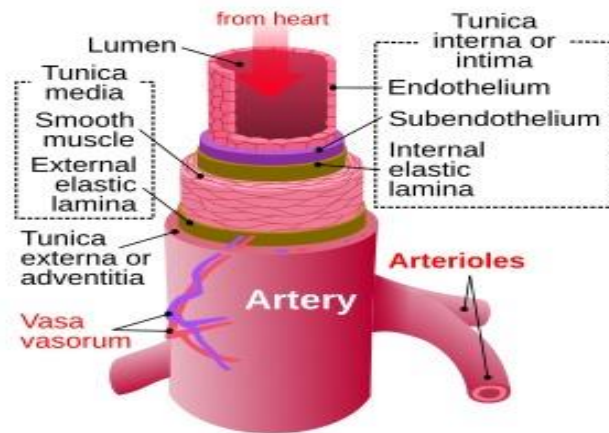


Figure 3: Structure des vaisseaux sanguins (Mercadante & Raja, 2020).

5.2 Cascade d'évènements impliqués dans l'athérogénèse

5.2.1 Stades athéroscléreux

Au cours de développement de l'athérosclérose, la plaque athéromateuse passe par différents stades qui ont été classifiés par Stary (Stary et al., 1995) et l'AHA (American Heart Association) en six stades de gravité croissante en 1995, puis en huit stades en 2000. Cette classification suggère que l'évolution des lésions athérosclérotiques débute dans un âge précoce et progressent successivement d'un type lésionnel au type supérieur (**Figure 4**).

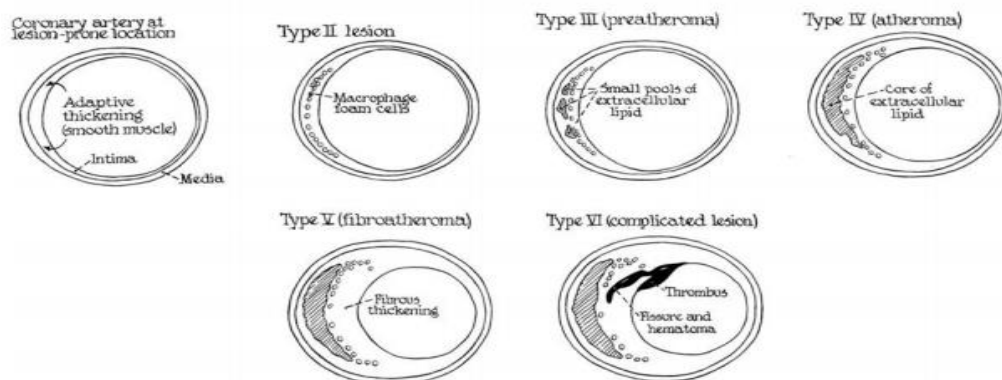


Figure 4: Présentation originale des différents stades de l'athérosclérose selon Stary (Stary et al., 1995).

Le premier stade correspond à ce que l'on appelle la strie lipidique (Alfarisi et al., 2020; Summerhill et al., 2019). Il est caractérisé par l'accumulation de lipides au niveau artériel, provoquant ainsi un épaissement de l'intima. Ces lésions précoces ne sont pas associées à des manifestations cliniques et on peut les rencontrer chez les enfants et les adultes. L'oxydation des LDL au niveau de l'endothélium et de l'intima favorise le recrutement des monocytes circulants (Sanchez, 2017). Sous l'action des facteurs de croissance libérés par les

cellules musculaires lisses (CML), les monocytes circulants se transforment en macrophage permettant ainsi la phagocytose des LDL oxydées formant ce que l'on appelle des macrophages spumeux (Alfarisi et al., 2020; Kowara & Cudnoch-Jedrzejewska, 2021; Sanchez, 2017).

Dans un second temps, l'accumulation des cellules spumeuses, qui se regroupent en petits amas au niveau de la couche sous-endothéliale de l'intima, provoque la formation des stries lipidiques (fatty streaks) (Summerhill et al., 2019). C'est au niveau du troisième stade que des lipides extracellulaires (faible quantité) s'accumulent à côté des macrophages spumeux (Sary et al., 1994). C'est l'association des lipides internes et externes qui favorise la formation du noyau athéromateux de la plaque d'athérosclérose (Sanchez, 2017). Ce stade survient à un âge plus tardif (après 20 ans) et n'est pas associé à des manifestations cliniques.

Les stades IV et V sont caractérisés par la formation d'un noyau lipidique (ou athéromateux) et ils apparaissent surtout après 40 ans. Le noyau lipidique est entouré d'une enveloppe fibreuse et il est constitué d'un mélange de macrophages spumeux, de lipides extracellulaires, de cristaux de cholestérol et de débris cellulaires (Belcastro, 2017). Le cœur lipidique augmente avec le temps ce qui provoque une réduction progressive de la lumière des vaisseaux (Zivkovic, 2016). La plaque fibro-lipidique va évoluer vers une plaque fibreuse constituée essentiellement de cellules musculaires lisses, de cellules spumeuses et d'un noyau lipidique (Sissoko, 2020). La chape fibreuse est constituée uniquement de matrice extracellulaire riche en collagène et en glycoprotéines et de cellules musculaires lisses (Sissoko, 2020; Zivkovic, 2016).

Le stade VI est le stade le plus évolué, il est caractérisé par l'apparition de la plaque d'athérosclérose compliquée (Sissoko, 2020; Zivkovic, 2016). Il se produit des lésions avec des modifications tels qu'une calcification de la paroi artérielle, hémorragie, apparition des cellules inflammatoires voir la formation d'un thrombus (Zivkovic, 2016). On peut différencier entre une plaque compliquée stable qui est constituée d'une chape fibreuse épaisse et peu de cellules inflammatoires et une plaque instable qui possède une chape fibreuse très fine et un grand nombre de cellules inflammatoires (Sanchez, 2017). Les lésions tardives et compliquées surviennent principalement après 40 ans et peuvent se traduire par des manifestations cliniques qui sont mortelles.

5.2.2 Dysfonction endothéliale et oxydation des LDL

L'endothélium vasculaire est constitué d'une couche unicellulaire de cellules endothéliales qui recouvre la face interne des vaisseaux sanguins (Chia et al., 2020; Medina-

leyte et al., 2021). En raison de son emplacement entre la circulation et la paroi vasculaire, l'endothélium interagit avec les médiateurs cellulaires et hormonaux de ces deux compartiments. Il participe au maintien de l'homéostasie vasculaire, la régulation du tonus vasculaire et la circulation sanguine via la production de substances vasoactives et anti-thrombotiques comme le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines (prostacycline) et des agents vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 (ET), le thromboxane A₂ et l'angiotensine II (Chia et al., 2020; Medina-leyte et al., 2021).

Le monoxyde d'azote (NO) est la substance la plus importante, elle est responsable de plusieurs effets bénéfiques, il stimule la prolifération des cellules endothéliales, il est impliqué dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la prolifération des cellules musculaires lisses, et dans l'inhibition de l'oxydation des LDL par un effet antioxydant local (Chen et al., 2018; Roux-mallouf, 2020; Sanchez, 2017). Le NO joue un rôle physiologique important dans la régulation de la pression et du débit sanguin et a été largement utilisé comme marqueur clinique de la fonction endothéliale. Il provoque une vasodilatation via la stimulation de l'activité de la guanylate cyclase dans les cellules musculaires lisses (Kollau et al., 2018; Pirahanchi & Dimri, 2020; Roux-mallouf, 2020).

L'altération de la fonction endothéliale est souvent déclenchée par un déséquilibre entre les facteurs vasoprotecteurs endothéliaux tels que le NO, l'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium, un état de stress oxydatif élevé et les vasoconstricteurs générés (Auger et al., 2016; Roumeliotis et al., 2020). La diminution de la biodisponibilité du NO peut résulter de la peroxydation lipidique, du stress oxydatif, des réponses inflammatoires et des modifications dans les systèmes cardiovasculaires, qui ont été considérés comme l'une des causes principales des lésions endothéliales et de l'apparition de l'athérosclérose (Chen et al., 2018). Aussi, de nombreux facteurs peuvent influencer la fonction endothéliale, ce qui provoque une diminution de la production du monoxyde d'azote (NO) et donc de ses rôles protecteurs. L'hypercholestérolémie, la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'obésité, la sédentarité et le diabète ainsi que des taux élevés de protéine C réactive (CRP), de phospholipase A₂ et d'homocystéine ont été liés au dysfonctionnement endothélial (Daiber et al., 2019). La perte de l'activité endothéliale du monoxyde d'azote (NO) contribue à une altération de la relaxation vasculaire, à une agrégation plaquettaire élevée, et une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses (Roux-mallouf, 2020). En outre, l'inactivation du NO endothélial par l'anion superoxyde (O²⁻) diminue la

biodisponibilité du NO et entraîne une tolérance aux nitrates, une vasoconstriction et une hypertension (Akhigbe & Ajayi, 2021; Loperena & Harrison, 2017).

De nombreuses études ont montré que le dysfonctionnement endothélial est l'une des premières manifestations de l'athérosclérose (Little et al., 2021; Poredos et al., 2021), ce qui est illustré par l'observation clinique selon laquelle les événements cardiovasculaires athérosclérotiques surviennent plus fréquemment chez les patients présentant un dysfonctionnement endothélial sévère que chez les patients présentant un dysfonctionnement endothélial léger ou modéré (Suwaidi et al., 2000). En effet, la plupart des facteurs de risque d'athérosclérose activent l'endothélium et peuvent induire un dysfonctionnement endothélial (Souihol et al., 2018). L'activation endothéliale, déclenchée par les facteurs de risque de l'athérosclérose, notamment les LDL oxydées et les cytokines inflammatoires, est généralement considérée comme la première étape de l'athérogenèse (Fledderus et al., 2021; Singla et al., 2021). L'activation des cellules endothéliales entraîne la perte des jonctions intercellulaires et affecte donc la perméabilité de la paroi vasculaire aux macromolécules telles que les LDL (Fledderus et al., 2021). Dans la paroi vasculaire, les LDL subissent des modifications oxydatives via son interaction avec des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et il est bien connu que ces LDL oxydées (oxLDL) sont pro-inflammatoires et constituent un des facteurs majeurs déclenchant l'athérogenèse (Gąsecka et al., 2021; Poznyak et al., 2021; Singla et al., 2021).

Il existe une forte corrélation entre les facteurs de risque athérogènes et le dysfonctionnement endothélial (Poredos et al., 2021). Les LDL en particulier les LDL oxydées (ox-LDL) sont un puissant inhibiteur de la fonction endothéliale (Li et al., 2021). Les mécanismes par lesquels les LDL inhibent l'activité endothéliale du NO comprennent la baisse de l'expression endothéliale du NOS, la diminution de la libération du NO médiée par les récepteurs et l'inactivation du NO par l'augmentation de la production de l'anion superoxyde (O_2^-) (Akhigbe & Ajayi, 2021; Gradinaru et al., 2015).

Le stress oxydant joue un rôle majeur dans la perméabilité vasculaire des LDL ce qui facilite leur infiltration au niveau de l'espace sous-endothélial (Izzo et al., 2021; Kattoor et al., 2017). Les LDL s'associent aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire via une interaction ionique entre l'apo B-100 (chargée positivement) et les chaînes glycosaminoglycanes des protéoglycanes (chargés négativement) (Allahverdian et al., 2020; Hardy, 2019). Les LDL subissent une oxydation sous l'action des enzymes 12- et 15-lipoxygénases, la myéloperoxydase (MPO), et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS)

sécrétées au niveau des macrophages et des cellules endothéliales (Frégeau, 2020; Poznyak et al., 2021). La pénétration des LDL oxydées (ox-LDL) au niveau endothélial se fait via des récepteurs spécifiques en fonction du degré d'oxydation. Le récepteur LOX-1 et le récepteur classique des LDL (LDL-r) facilitent la pénétration des LDL faiblement oxydées alors que le récepteur SR-A favorise l'infiltration des LDL moyennement oxydées (Bonneville, 2018). L'oxydation des LDL commence au niveau de la partie lipidique et provoque la formation de peroxydes et de composés aldéhydes (le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéol (4-HNE)) (Barrera et al., 2018; Gianazza et al., 2019). Cette oxydation passe par trois étapes : l'initiation, la propagation et finalement la terminaison (Gianazza et al., 2019; Maurent, 2017; Pateiro et al., 2019).

La première phase dans la peroxydation lipidique est l'initiation (**Figure 5**). Elle débute par l'action des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sur les acides gras polyinsaturés des LDL. Les principaux radicaux libres qui vont initier la peroxydation lipidique sont les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et hydroperoxydes (HOO^\bullet) (Maurent, 2017). La fixation de l'oxygène sur les doubles liaisons, conduit à la formation de lipides hydroperoxylés (LOOH) et de lipides hydroxylés (LOH).

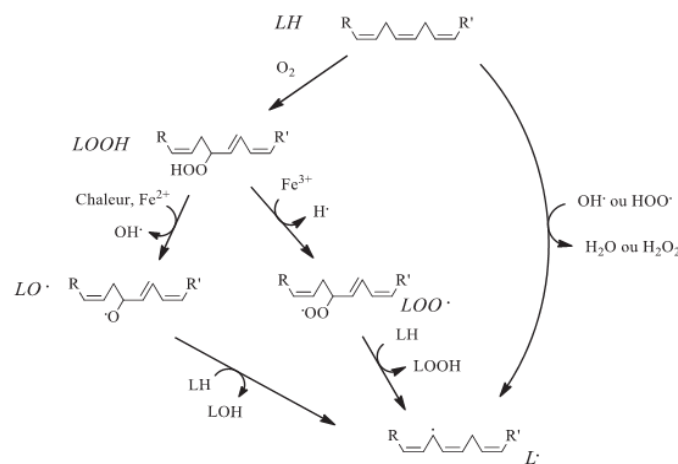


Figure 5: Phase d'initiation de l'oxydation lipidique (Maurent, 2017).

La deuxième phase de la peroxydation lipidique est la propagation. Le radical alkyle (L^\bullet) va réagir avec un autre acide gras polyinsaturé pour donner naissance à un autre radical alkyle. Ce dernier va se réarranger pour former un autre radical alkyle et un diène conjugué. Le radical alkyle va réagir rapidement avec une molécule d'oxygène conduisant ainsi à la formation d'un radical peroxyde LOO^\bullet (Pateiro et al., 2019; Su et al., 2019). Ce dernier va réagir avec un autre acide gras polyinsaturé pour former un hydroperoxyde d'acide gras et un

autre radical alkyle (Pateiro et al., 2019; Su et al., 2019). Les peroxydes cycliques synthétisés conduisant à la formation par la suite d'isoprostane (Maurent, 2017) (**Figure 6**).

La dernière étape de cette peroxydation est la terminaison. Cette phase est caractérisée par la neutralisation des radicaux des acides gras polyinsaturés pour former des espèces non-radicalaires (alkanes, alcools, cétones, aldéhydes, acides carboxyliques) ; ce qui permet l'arrêt de la réaction de peroxydation (Pateiro et al., 2019; Su et al., 2019). Les antioxydants peuvent également arrêter la propagation de la chaîne radicalaire en piégeant les radicaux peroxydes (Maurent, 2017). Un composé antioxydant pourrait transférer un atome d'hydrogène à une espèce radicalaire issue de l'oxydation des lipides. Cette réaction neutralise le radical lipidique et crée un nouveau radical à partir du composé antioxydant, qui est beaucoup moins réactif. Cependant, les réactions de terminaison ne sont pas toujours efficaces et peuvent conduire à de nouveaux composés réactifs. Le mécanisme qui assure une terminaison efficace est la décomposition des radicaux peroxy et alcoxy pour donner naissance à des produits secondaires tels que des alcanes, des alcools et des composés carbonylés (Pateiro et al., 2019).

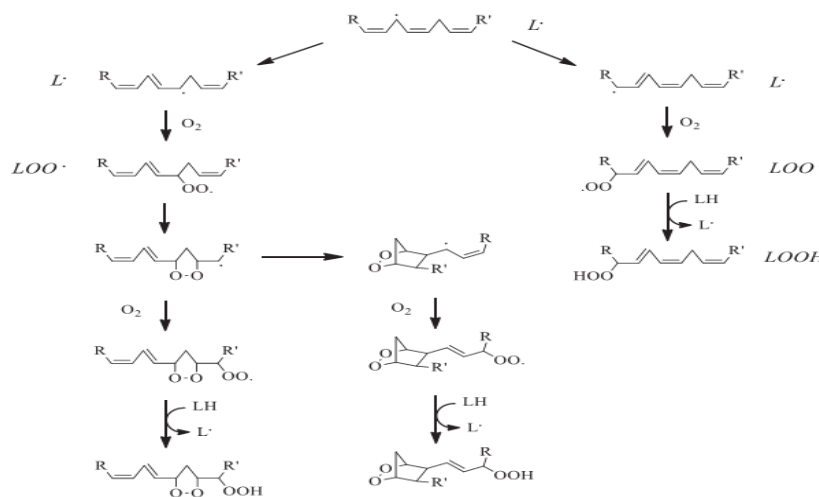


Figure 6: Étapes de propagation de l'oxydation lipidique (Maurent, 2017).

Il existe deux grandes catégories de LDL oxydées, les LDL minimalement oxydées (LDLmm) qui ont la capacité de se lier au récepteur des LDL (LDL-r) (Bujold, 2011) comme on a déjà mentionné. Ces lipoprotéines ont le pouvoir d'activer les cellules endothéliales provoquant ainsi la sécrétion de MCS-F (macrophage colony-stimulating factor) et le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) qui sont des médiateurs des réactions inflammatoires (Kang et al., 2021). Le MCP-1 joue un rôle majeur dans le recrutement des monocytes circulants (Kang et al., 2021; Kim et al., 2020). La deuxième catégorie est les LDL hautement

oxydées (LDLox), qui sont caractérisées par une concentration élevée de MDA et qui sont impliquées dans la formation des macrophages spumeux.

5.2.3 Recrutement des monocytes circulants et formation des macrophages spumeux

Le recrutement des monocytes est probablement la première étape dans la formation de la plaque d'athérosclérose, qui est activée par un processus régulé en plusieurs étapes et orchestré par des chimioattracteurs (MCP-1/CCL2, CX3CL1), des molécules d'adhésion cellulaires (CAM) et de leurs récepteurs (Kang et al., 2021; Kim et al., 2020). L'invasion de la paroi artérielle peut se produire en raison de la nature de sa défense contre l'infection, mais dans ces événements physiopathologiques, elle conduit au développement de l'athérosclérose.

Suite à un dysfonctionnement endothélial causé par l'infiltration et l'oxydation des LDL au niveau de l'intima, les cellules endothéliales vont s'activer provoquant ainsi une cascade de recrutement de monocytes et de lymphocytes au niveau de la paroi vasculaire, impliquant la fixation et le roulement initial dépendant de la sélectine, le déclenchement de l'adhésion par l'intermédiaire des chimiokines et de leurs récepteurs ou par la liaison de la sélectine au ligand glycoprotéine P-sélectine 1 (PSGL-1); l'adhésion dépendant de l'intégrine; et finalement la migration à travers l'endothélium (Kang et al., 2021; Kim et al., 2020; Yin et al., 2021) (**Figure 7**).

Les sélectines, à savoir (P-, L- et E-sélectine), servent de médiateurs dans l'interaction initiale des monocytes avec l'endothélium (Yin et al., 2021). La sélectine L est exprimée sur la surface des monocytes tandis que les sélectines P et E sont exprimées au niveau de la surface endothéliale (Yin et al., 2021). L'adhérence lâche et transitoire (le rolling) est stimulée par la liaison des sélectines avec la PSGL-1, qui est exprimée par les monocytes et les cellules endothéliales (Kang et al., 2021; Yin et al., 2021). L'activation de la PSGL-1 se fait par les voies de signalisation de la kinase Src, de la protéine kinase activée par mitogènes MAPK (mitogen-activated protein kinase) et de la tyrosine kinase (Mishchenko et al., 2021). La liaison de la PSGL-1 avec la sélectine P ou la sélectine E favorise l'adhésion des neutrophiles via l'intégrine β -2, au fibrinogène et à l'ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire 1) (Kim et al., 2020; Mishchenko et al., 2021; Yin et al., 2021). La forte fixation des monocytes à la surface endothéliale est due aux interactions des intégrines avec les ligands appartenant à la superfamille des immunoglobulines, en particulier la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM-1) (Kang et al., 2021; Kim et al., 2020; Mishchenko et al., 2021; Yin et al., 2021). De plus, l'intégrine VLA-4 (very late antigen-4) participe à l'adhésion lâche des monocytes

via sa fixation avec son ligand endothélial la VCAM-1 (Kang et al., 2021; Kim et al., 2020; Mishchenko et al., 2021). De puissants facteurs chimioattractifs tels que MCP-1 et IL-8 induisent ensuite la migration des monocytes dans l'espace sous endothélial (Kang et al., 2021; Mishchenko et al., 2021).

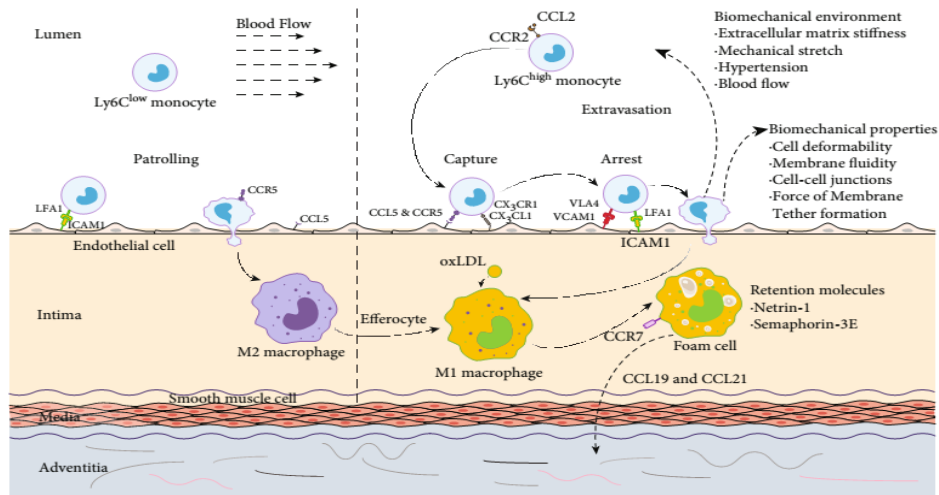


Figure 7: Recrutement des monocytes circulants au niveau de l'espace sous-endothélial (Kang et al., 2021).

Lors du développement de lésions athérosclérotiques, de nombreux facteurs chimiotactiques sont sécrétés. Ceux-ci comprennent la protéine chimio-attractante des monocytes-1 (MCP-1), le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF), le facteur de stimulation des colonies de granulocytes/macrophages (GM-CSF), la protéine inflammatoire migratoire (MIP-1), le TNF- α , le facteur de croissance transformant (TGF)- β , la chimiokine *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) et l'endothéline-1 (ET-1) (Čejková et al., 2016; Gencer et al., 2021; Marchini et al., 2021). La liaison du MCP-1 et de RANTES à leurs récepteurs CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) et CCR5 (C-C chemokine receptor type 5), va induire une activation des intégrines- β 1 et - β 2 à la surface des monocytes par une voie *inside-out* (Gencer et al., 2021).

Les monocytes circulants sont activés par une variété de cytokines pro-inflammatoires, dont l'interleukine IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), produites par les cellules de l'intima en réponse à des lipoprotéines modifiées (Kang et al., 2021; Kim et al., 2020; Mishchenko et al., 2021; Yin et al., 2021). Les LDL oxydés (ox-LDL) stimulent directement les monocytes induisant ainsi leur migration vers la paroi artérielle (Kang et al., 2021; Mushenkova et al., 2021). Suite à leur adhésion à l'endothélium, les

monocytes migrent à travers l'endothélium dans l'espace sous-endothélial de l'intima artériel (Checkouri et al., 2021). Les protéines de la superfamille des immunoglobulines, la molécule d'adhésion plaquettaire (PECAM)-1 et la molécule d'adhésion jonctionnelle-A (JAM-A), sont concentrées entre les cellules endothéliales et sont exprimées sur les leucocytes (Chistiakov et al., 2016). En s'engageant dans des interactions homotypiques à l'interface avec les leucocytes émigrés, JAM-A et PECAM-1 participent à la médiation de la diapédèse trans-endothéliale. Une fois piégés dans la paroi artérielle, les monocytes subissent une différenciation (Checkouri et al., 2021; Kang et al., 2021; Kim et al., 2020; Mishchenko et al., 2021; Yin et al., 2021). Dans l'intima artériel, les monocytes qui se différencient en macrophages se caractérisent par un volume cytoplasmique plus important contenant des vésicules, des vacuoles, des lysosomes primaires et secondaires. La différenciation des monocytes en macrophages est accompagnée d'une expression élevée de l'antigène CD68, qui est principalement situé dans les lysosomes des macrophages (Mishchenko et al., 2021; Yin et al., 2021). Le M-CSF est le principal régulateur de la différenciation des macrophages et sa présence a été démontrée dans les lésions athérosclérotiques (Lin et al., 2021).

5.2.4 La lésion complexe et la plaque fibreuse instable

a. Formation du cœur nécrotique

Le développement et la rupture des plaques d'athérome entraînent des maladies potentiellement mortelles telles que l'infarctus du myocarde, qui est l'une des principales causes de mortalité au niveau mondial (Sanchis-Gomar et al., 2016). Il est généralement connu que l'interaction entre l'activation des cellules endothéliales, l'infiltration des monocytes, l'internalisation des particules de lipoprotéines de basse densité (LDL) par les macrophages, la formation de cellules spumeuses, l'inflammation locale et la modification de la matrice extracellulaire (Libby et al., 2019) (**Figure 8**). Il va donc y avoir une accumulation des cellules spumeuses incapables d'éliminer les cellules apoptotiques et ces dernières vont se nécroser aboutissant à la formation d'un cœur nécrotique qui constitue la base de la pathogenèse des plaques d'athérome (Libby et al., 2019; Zernecke et al., 2020) (**Figure 8**). Les réactions immunitaires induites par différentes cytokines, ainsi que les forces hémodynamiques locales affectant les cellules endothéliales, régulent le développement de la plaque (Bäck et al., 2019). Néanmoins, de nombreux aspects des mécanismes physiopathologiques et des voies moléculaires conduisant à l'initiation et à la progression de la plaque d'athérome restent encore à découvrir.

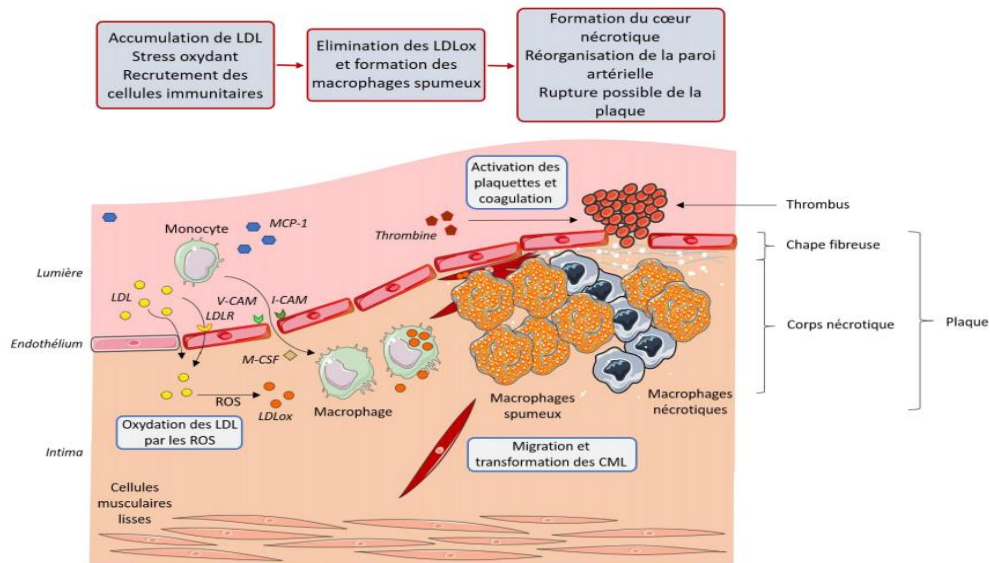


Figure 8: Les étapes de la formation et de la rupture de la plaque athéromateuse (Borowczyk, 2021).

5.2.5 Évolution de la plaque

Un flux laminaire perturbé provoque un dysfonctionnement endothélial, ce qui permet aux particules des LDLs de traverser la couche endothéliale et de s'accumuler au niveau de l'intima (Little et al., 2021). Après modification (oxydation causée par la myéloperoxydase dérivée des cellules inflammatoires), les particules LDLs activent les récepteurs CD36 au niveau des macrophages, qui créent des complexes avec les récepteurs TLR4 (toll like receptor 4) et TLR6 (toll like receptor 6) et transmettent un signal intracellulaire conduisant à l'activation de NF- κ B et à l'expression de chimiokines (Hopkins, 2013; Poznyak et al., 2021). Les chimiokines (notamment les chemokines ligands CCL2, CCL5 et le facteur plaquettaire CXCL4) stimulent l'infiltration des cellules immunitaires dans l'intima (Márquez et al., 2021). Le développement de la plaque d'athérome est initié. Les macrophages phagocytent de plus en plus de particules de LDL et se transforment en cellules spumeuses, qui sont sensibles à l'apoptose et, finalement, à la nécrose (en raison d'une éfferocytose altérée médié par la tyrosine-protéine kinase Mer (MertK) (Zhang et al., 2022). Les cellules musculaires lisses passent d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétant et synthétisent les composants de la matrice extracellulaire (les protéoglycanes et les collagènes), ce qui entraîne une augmentation de la taille totale de la plaque (Borowczyk, 2021). De plus, les cristaux de cholestérol apparaissent simultanément dans les macrophages induisant ainsi la synthèse d'interleukine-1-bêta (IL-1 β) via l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor 3), ce qui renforce l'état inflammatoire au niveau de la plaque (Jin & Fu, 2019; Soehnlein & Libby, 2021). D'autres cellules immunitaires infiltrées dans la plaque, les neutrophiles, les

lymphocytes T et B et les cellules dendritiques orchestrent des réactions susceptibles de conduire à la déstabilisation et à la rupture de la plaque, qui se manifeste cliniquement par un syndrome coronarien aigu (Borowczyk, 2021; Poznyak et al., 2021; Soehnlein & Libby, 2021).

6 Complications cliniques

Le développement de la plaque d'athérosclérose sur la paroi des artères peut s'installer dans différents territoires vasculaires. On peut distinguer trois localisations préférentielles provoquant des conséquences cliniques importants : les artères carotides, les artères coronaires et les artères iliaques.

L'installation de la plaque athérosclérotique au niveau des artères coronaires peut provoquer l'apparition de différentes manifestations cliniques (Bentzon et al., 2014; Kumar et al., 2021). Le patient, en cas de sténose modérée et de survenue progressive, peut ressentir au repos ou pendant un effort physique une douleur au niveau de la poitrine, c'est ce que l'on appelle l'angor ou l'angine de poitrine. L'angine de poitrine se définit comme étant un déséquilibre entre l'apport et la demande en oxygène au niveau du myocarde (aussi appelée ischémie myocardique) (Goyal & Zeltser, 2021). Par contre, si la sténose s'aggrave brutalement à cause de la rupture de plaque ce qui provoque une occlusion complète, le patient souffrira d'un syndrome coronarien aigu ou infarctus du myocarde (IM) (Luo et al., 2021).

Au niveau des membres inférieurs, si la plaque est localisée au niveau des artères iliaques ou fémorales, on peut avoir différentes conséquences cliniques (Kasapis & Gurm, 2010; Zemaitis et al., 2021). De la même façon qu'au niveau du myocarde, en cas d'occlusion progressive (partielle ou complète), le patient peut ressentir une douleur pendant un effort due à une ischémie à l'effort, que l'on appelle la claudication intermittente (Zemaitis et al., 2021). En revanche, pendant le repos, aucune douleur n'est ressentie. Il faut noter que si l'occlusion, même complète, intervient progressivement, elle ne causera pas forcément de conséquences cliniques majeures, grâce au développement d'une circulation collatérale (Santamarina-Fojo et al., 2004) permettant ainsi l'apport de sang oxygéné au reste du membre inférieur. Néanmoins, dans le cas d'une occlusion brutale et complète, le patient peut souffrir d'une ischémie aiguë des membres, avec l'apparition du pronostic du membre inférieur (Zemaitis et al., 2021).

Finalement, l'installation de la plaque localisée au niveau des artères carotidiennes peut également avoir des conséquences cliniques graves au niveau du cerveau, selon le caractère

vulnérable à risque embolique de la plaque (Ihle-Hansen et al., 2021; Poredos & Jezovnik, 2021). Comme expliqué précédemment, dans le cas d'une occlusion progressive, il est possible que le patient ne souffre pas de conséquences cliniques. En revanche, en cas d'occlusion brutale et complète, le patient peut souffrir d'un accident vasculaire cérébral pouvant causer la perte de vision d'un œil, ou un déficit moteur selon la localisation cérébrale de l'ischémie (Ihle-Hansen et al., 2021; Poredos & Jezovnik, 2021).

7 Traitements de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie compliquée d'épisodes aigus. Le traitement de cette pathologie ne peut être qu'un traitement au long cours, celui d'une vie. Une approche préventive basée sur une amélioration de la qualité de l'environnement et les modes de vie reste une priorité des axes de la prévention primaire de l'athérosclérose. Néanmoins, dans la majorité des cas, les mesures préventives ne suffisent pas à réduire l'influence des facteurs de risque. Il est important d'utiliser différentes classes médicamenteuses afin de prévenir l'apparition des maladies cardiovasculaires et de survenue les manifestations ischémiques. Il existe plusieurs traitements médicamenteux, on va citer deux types : les antiagrégants plaquettaires et les statines.

Les antiagrégants plaquettaires ont pour but d'inhiber l'agrégation plaquettaire et de diminuer le risque de formation d'un caillot après formation de la plaque d'athérosclérose. Ils inhibent l'activation plaquettaire par différentes voies. L'acide acétylsalicylique ou aspirine est le seul représentant de la famille des inhibiteurs des cyclo-oxygénases. C'est un inhibiteur irréversible de la cyclooxygénase-1, une enzyme qui favorise la production de thromboxane A₂, une molécule qui stimule l'agrégation et la prolifération plaquettaire ainsi que la vasoconstriction (Jansen et al., 2002; Zambon et al., 2003) (**Figure 9**).

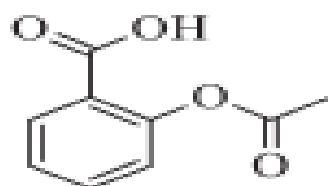


Figure 9: Structure chimique de la molécule d'aspirine.

Le ticlopidine, le clopidogrel et le pasugrel sont des traitements médicamenteux qui appartiennent à la famille des inhibiteurs du récepteur P₂Y₁₂. Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la fixation de l'adénosine diphosphate (ADP), d'une façon irréversible, sur le récepteur P₂Y₁₂ de la plaquette. Ce récepteur est couplé à une adénylate cyclase qui

favorise l'agrégation plaquettaire. Ces trois molécules sont des pro-drogues nécessitant une activation par le métabolisme hépatique via le cytochrome P450. Il existe également des antagonistes réversibles tels que le ticagrelor (Dugi et al., 2001; Han et al., 2019) (**Figure 10**).

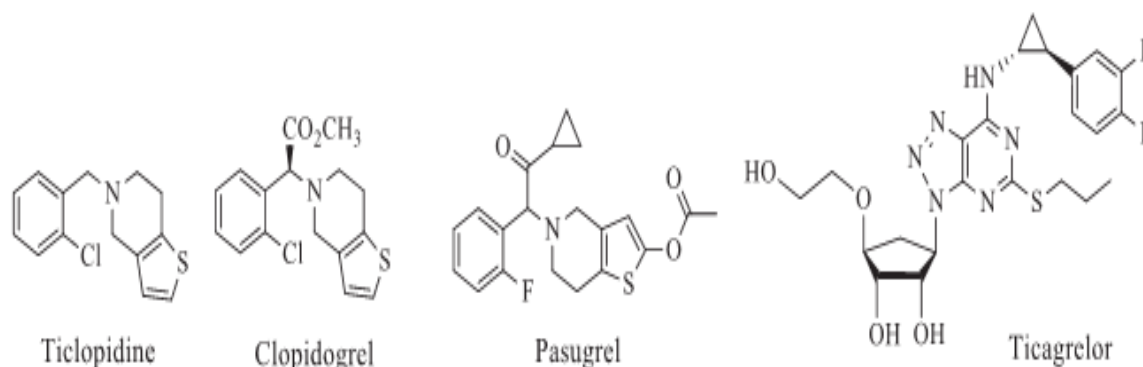


Figure 10: Structures chimiques du ticlopidine, du clopidogrel, du pasugrel et du ticagrelor.

Le cilostazol est un inhibiteur la phosphodiesterase III (Connelly & Hegele, 1998), il s'agit d'un vasodilatateur et un antiagrégant plaquettaire qui provoque une diminution modérée de la tension artérielle (**Figure 11**).

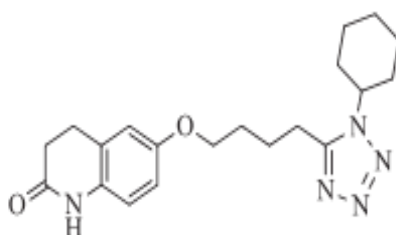


Figure 11: Structure chimique du cilostazol.

Un dernier type d'antiagrégants plaquettaires, les inhibiteurs de la glycoprotéine GP IIb/IIIa des thrombocytes. Nous pouvons citer l'abciximab, un inhibiteur non-compétitif, qui est une protéine constituée par le fragment Fab de l'anticorps monoclonal chimérique humain-murin 7E3 (Zambon et al., 2001).

Les statines sont une famille thérapeutique qui inhibent l'HMG-CoA réductase (hydroxyméthylglutaryl Co-enzyme A) (Atar et al., 2021), une enzyme impliquée dans la synthèse hépatique du cholestérol (Cassagnol, 2021). Elles agissent en inhibant cette enzyme d'une façon compétitive (Sizar et al., 2021). L'inhibition de l'HMC-CoA réductase stimule l'expression des récepteurs LDL provoquant leur pénétration au niveau de la cellule. Elles diminuent la concentration plasmatique du cholestérol-LDL, des triglycérides, des VLDL ; et augmentent la concentration du cholestérol HDL de 10%. Elles aident ainsi à stabiliser

l'évolution de la plaque d'athérome. Les statines sont utilisées principalement chez les patients qui présentent un risque cardiovasculaire élevé (un risque important d'une maladie cardiovasculaire, un taux élevé de cholestérol-LDL dans le sang, un diabète, une hypertension). Nous pouvons citer dans cette classe l'atorvastatine (Tahor®, Lipitor®) et la simvastatine (Lodales®, Zocor®) (**Figure 12**).

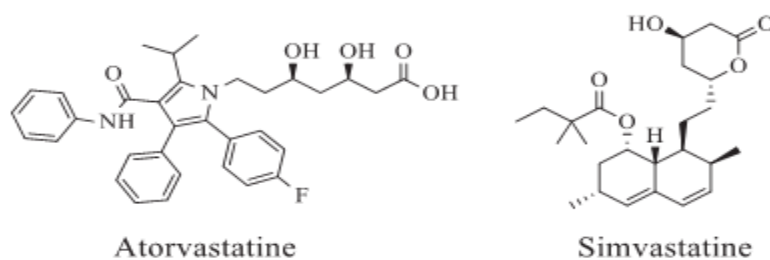


Figure 12: Structures chimiques de l'atorvastatine et de la simvastatine.

Les statines sont des inhibiteurs de l'HMGCR (Atar et al., 2021). Elles altèrent la structure de l'enzyme et empêchent la synthèse endogène de cholestérol (Cassagnol, 2021). L'expression du gène *HGMCR* est sous la dépendance du facteur de transcription SREBP-2. Des études du gène *LDLR* ont montré que celui-ci présente aussi un site de reconnaissance au SREBP-2 (Brown and Goldstein, 1997). En présence de cholestérol, le facteur de transcription SREBP-2 est ancré à la membrane du réticulum endoplasmique par le complexe protéique Insig-1/Scap (Insulin induced gene-1/SREBP cleavage activator protein). Ce complexe protéique constitue un senseur de la concentration en cholestérol dans la membrane du RE. Lorsque celle-ci diminue, Scap se détache d'Insig-1 et entraîne SREBP-2 vers le Golgi dans une vésicule à COPII. Dans le Golgi, les protéases S1P et S2P clivent SREBP-2. SREBP-2 clivé est transloqué vers le noyau où il se fixe au promoteur et active l'expression de gènes cibles comme le LDLR (Horton et al. 2002; Brown and Goldstein, 2009; Goldstein and Brown, 2009).

Les statines sont généralement sûres et bien tolérées. Cependant, certains patients sont intolérants aux statines. Les effets secondaires les plus fréquents sont les douleurs musculaires, crampes et dans des cas plus rares la survenue prématurée du diabète de type 2 chez des individus prédisposés (Toth et al. 2018). Des traitements alternatifs sont élaborés afin de faire diminuer le taux de cholestérol circulant de ces patients.

L'utilisation de la nanotechnologie dans la gestion de l'athérosclérose est une direction passionnante à suivre pour compléter les méthodes de traitement actuelles (Peters et al., 2021). Bien que l'approche anti-inflammatoire soit un schéma thérapeutique populaire, le

choix des molécules anti-inflammatoires appropriées nécessite une réflexion. La prednisolone, un corticostéroïde, a montré une forte accumulation dans les macrophages de la plaque lorsqu'elle était formulée dans une nanoparticule liposomale (LN-PLP) (Lobatto et al., 2010). Des études *in vitro* ont montré des effets lipotoxiques du LN-PLP lorsqu'il est incubé avec des macrophages (van der Valk et al., 2016). Un autre exemple est une étude qui a comparé l'effet des médicaments antiprolifératifs utilisés dans le traitement de la resténose vasculaire (Chen et al., 2021). Bien que les nanoparticules de sirolimus et de paclitaxel exercent toutes deux des effets antiprolifératifs dans des conditions de normoxie, la nanoparticule de sirolimus a montré un effet significativement plus élevé dans des conditions d'hypoxie (Hossaini & Huang, 2021). Par conséquent, la nanoparticule de sirolimus serait un meilleur candidat pour le traitement de l'athérosclérose en raison de la présence d'un microenvironnement hypoxique dans les plaques (Hossaini & Huang, 2021). Ces résultats soulignent l'importance du choix du médicament dans le traitement de l'athérosclérose (Hossaini & Huang, 2021).

Lorsque les symptômes ne sont pas contrôlés par les traitements médicamenteux, un traitement chirurgical est mis en place. Le plus courant est l'angioplastie qui correspond à une chirurgie endovasculaire, avec la mise en place d'une endoprothèse au niveau de la paroi vasculaire. L'artère peut être également désobstruée par endartériectomie. Il s'agit d'une technique de revascularisation dont le principe est d'enlever en bloc la plaque d'athérome par clivage dans la média, et en ne laissant que l'adventice de l'artère. Un pontage peut être réalisé pour contourner l'artère obstruée ou sténosée causée par la plaque athéromateuse.

Chapitre II : Systèmes phénoliques antioxydants et antiathérogènes

1 Introduction

Les composés phénoliques sont définis comme étant des métabolites secondaires provenant soit de la voie des polycétides ou la voie shikimate/phénylpropanoïde, qui fournit directement des phénylpropanoïdes. Leur structure est caractérisée par la présence d'un cycle aromatique, contenant un ou plusieurs substituant hydroxyle (Tsao, 2010). Les composés phénoliques ont été largement étudiés pour leur capacité à réduire le stress oxydant, qui est lié à plusieurs troubles métaboliques et à de nombreuses pathologies, à savoir l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires... (Furukawa et al., 2004).

Lorsque les systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques) sont dépassés par une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de pro-oxydants, le stress oxydant est installé, ce qui entraîne des dommages aux macromolécules cellulaires (Burton & Jauniaux, 2011). Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est lié à leur capacité de réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (HO°) et les radicaux superoxydes (O_2°). De plus, ils ont la capacité de chélateur des métaux, en particulier le fer et le cuivre, inhibant ainsi la formation de radicaux libres catalysée par les métaux de transition et aussi leur affinité pour une grande partie des protéines dont certains récepteurs et enzymes. La structure du phénol est liée à leur activité de piégeage des radicaux libres et de chélation des métaux. Le nombre de leur position par rapport au groupe fonctionnel carboxyle influence l'activité antioxydante des composés phénoliques (Balasundram et al., 2006). Dans ce chapitre nous présenterons les différentes classes des composés phénoliques, leur activité antioxydante et leur pouvoir antiathérogène.

2 Classification et biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont l'un des métabolites secondaires les plus répandues dans le règne végétal. Ils sont dérivés de la voie du pentose phosphate, du shikimate et des phénylpropanoïdes dans les plantes (**Figure 13**). Ils jouent un rôle important dans la fertilité, la lignification, et la pigmentation des plantes, ainsi que la protection contre les agents biotiques ou abiotiques (Hahlbrock & Scheel, 1989; Shirley, 1996). En outre, ils contribuent à la couleur et à la perception sensorielle des plantes.

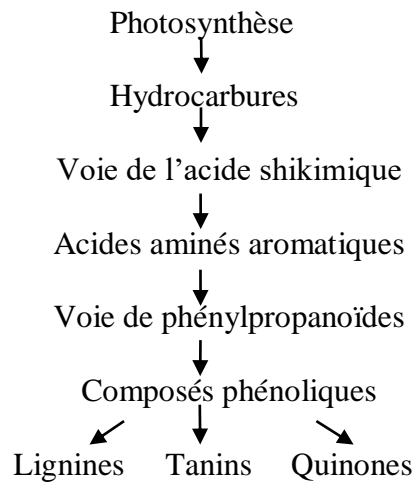


Figure 13: Voie de biosynthèse des composés phénoliques.

Leur structure comprend un cycle aromatique, contenant un ou plusieurs substituant hydroxyle. Ils peuvent aller de simples molécules phénoliques à des composés polymérisés. En raison de la diversité de leur structure, il existe une large gamme de composés phénoliques qui sont présents dans la nature. Actuellement, plus de 8000 structures de composés phénoliques sont connues. Elles peuvent être classées en plusieurs classes comme le montre le **Tableau 1** (Del Rio et al., 2013). Les principales classes de composés phénoliques présents dans l'alimentation humaine sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les lignines.

Tableau 1 : Classification des composés phénoliques

Classe	Structure
Phénols simples, benzoquinones	C6
Acides hydroxybenzoïques	C6-C1
Acides hydroxycinnamiques, phénylpropanoïdes	C6-C3
Acétophénone, acides phénylacétiques	C6-C2
Xanthones	C6-C1-C6
Stilbènes, anthraquinones	C6-C2-C6
Flavonoïdes, iso-flavonoïdes	C6-C3-C6
Lignanes	(C6-C3) ₂
Lignines	(C6-C3) _n
Tanins condensés	(C6-C3-C6) _n

3 Polyphénols monomériques

3.1 Acides phénoliques

Chimiquement, les acides phénoliques ont au moins un cycle aromatique où un hydrogène est substitué par un groupe hydroxyle (Heleno et al., 2015). Ils sont divisés en deux groupes : les dérivés de l'acide benzoïque (acide vanillique, acide gallique) et les dérivés de l'acide cinnamique (acide caféique, coumarique, sinapique et férulique). Ces derniers possèdent une bonne activité antioxydante. Ils sont synthétisés par la voie du shikimate, dans lequel la L-phénylalanine ou la L-tyrosine est la substance de base (Williamson, 2017).

Les principales réactions responsables de la synthèse de l'acide phénolique à partir de la L-phénylalanine ou de la L-tyrosine sont la désamination, l'hydroxylation et la méthylation. Tout d'abord, la phénylalanine et/ou la tyrosine subissent une désamination via une enzyme clé du métabolisme des composés phénoliques : Ammonia-lyase, qui donne des acides cinnamiques et/ou *p*-coumarique, respectivement.

Les cycles aromatiques des acides cinnamiques et/ou *p*-coumarique sont ensuite hydroxylés et méthylés pour former des acides féruliques et de l'acide caféique. La chaîne latérale de l'acide cinnamique subit un raccourcissement via un mécanisme vraisemblablement proche de celui de la β oxydation des acides gras (**Figure 14**). L'acide benzoïque peut subir une hydroxylation et une méthylation, produisant ainsi des acides protocatéchiques et *p*-hydroxybenzoïques (Rice-Evans et al., 1996).

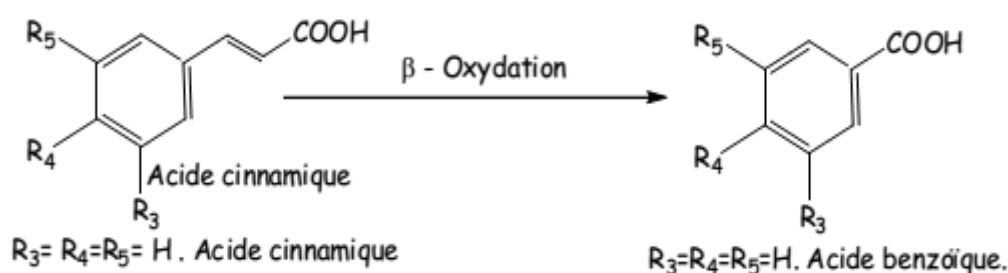


Figure 14: Acide cinnamique et acide benzoïque.

3.1.1 Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques (AHB) sont des dérivés de l'acide benzoïque, ils possèdent une structure générale de base de type C6-C1 avec quelques différences dues aux hydroxylations et/ou méthylation du noyau aromatique en diverses positions (2, 3 et 4). Les plus abondants sont l'acide salicylique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide gentisque, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gallique, et l'acide ellagique.

Ils sont présents dans les légumes et les fruits sous forme conjuguée (esters ou glycosides), alors qu'ils peuvent être libres dans certains fruits (par exemple, l'acide gallique dans les kakis) ou peuvent être libérés lors de la transformation des fruits ou des légumes (Tomas-Barberan & Clifford, 2000). L'acide gallique, qui peut être un dimère, un trimère ou un tétramère, est un exemple d'AHC conjugué (Clifford & Scalbert, 2000).

3.1.2 Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques AHC représentent une classe très importante des composés phénoliques dont la structure de base est de type C6-C3, avec une double liaison dans la chaîne latérale qui peut avoir une configuration *cis* ou *trans*. Dans les aliments, ils se présentent généralement sous forme de monomères, de dimères ou de polymères ; on les trouve sous forme de condensats avec des alcools, des acides hydroxylés ou des esters produisant des mono/disaccharides, ou peuvent être des amides par condensation avec des amines. Les principales sources alimentaires d'AHC sont les fruits, comme les pommes, les cerises, les baies diverses, les pêches, les prunes et certains agrumes. L'acide caféique et l'acide *p*-coumarique représentent entre 75% et 100% de la teneur totale en AHC des fruits, étant les AHC les plus abondants dans les fruits (D'Archivio et al., 2007). L'acide caféique se trouve dans le café, la myrtille, le raisin, la poire, la canneberge, la pomme et l'orange (Naczek & Shahidi, 2006). Pour l'acide coumarique, les principales sources de fruits sont le raisin, les cerises et les baies (Mattila et al., 2005).

3.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une très large gamme de substances naturelles appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont des dérivés du noyau flavone (ou 2-phenyl chromone) portant des fonctions éthers, glycosides ou phénols libres. Ils comprennent plus de 6000 composés parmi plus de 8000 composés phénoliques présents dans l'alimentation. Ils sont de faible poids moléculaire, caractérisés par un squelette de 15 atomes de carbone, disposés en C6-C3-C6 (Lafay & Gil-Izquierdo, 2008). La structure des flavonoïdes est essentiellement constituée de deux cycles aromatiques A et B, reliés par une chaîne en C3, souvent sous la forme d'un cycle hétérocyclique C (**Figure 15**). Les cycles C sont principalement responsables de la diversité des classes des flavonoïdes ; les variations dans leurs structures fournissent les principales classes de flavonoïdes, telles que les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols (catéchines), les isoflavones, les flavanonols et les anthocyanidines. Les variations dans les noyaux A et B donnent naissance aux différents composés de la classe

des flavonoïdes. Ces variations sont dues aux substitutions qui peuvent être l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, la sulfatation et l'acylation (Hoensch & Oertel, 2015).

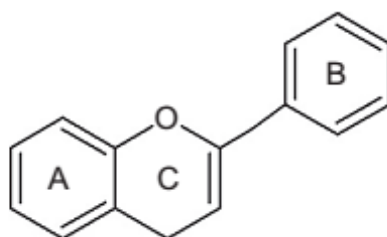


Figure 15: Structure de base des flavonoïdes.

La biosynthèse des flavonoïdes se fait par la voie des phénylpropanoïdes à partir d'un précurseur commun : la 4, 2, 4, 6-tétrahydroxychalcone. Les différentes sous-classes de flavonoïdes sont synthétisées à partir d'une molécule de base sous l'action d'un groupe d'enzymes, telles que les réductases, les isomérases, les hydroxylases et les dioxygénases (Martens et al., 2010). La première étape dans cette voie de biosynthèse est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner une chalcone : la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone sous l'action d'une enzyme la chalcone synthase (CHS). Si cette condensation est catalysée par une polyacétate-réductase à NADPH, c'est une 6'-desoxychalcone : la 4, 2',4'-trihydroxychalcone qui est alors formée. Cette chalcone est ensuite métabolisée sous l'action d'une chalcone isomérase (CHI) en 2S-flavanone (naringénine). La formation des flavanones, comme la naringénine, représente l'étape principale de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes : flavones, isoflavones et dihydroflavonols, dont les enzymes ont été caractérisés. Ces enzymes modifient la structure de base des flavonoïdes en ajoutant des sucres (D-glucose, lignine, arabinose, glucorhamnose, L-rhamnose, galactose), des groupes méthyle et/ou des fragments acyle ; ces modifications peuvent altérer leur interaction, leur solubilité et leur réactivité avec les cellules, conduisant à diverses activités physiologiques (Ferrer et al., 2008).

4 Polyphénols sous forme de polymère

4.1 Tannins

Les tanins sont des molécules avec un poids moléculaire élevé généralement compris entre 500 et 3000 Da. Ils possèdent une structure chimique particulièrement variable, mais comporte toujours une partie phénolique. Ils peuvent être classés chimiquement en deux groupes : les tanins hydrolysables et non hydrolysables ou condensés. Les tanins

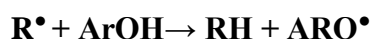
hydrolysables sont formés à partir de shikimate produisant des esters des acides phénols et de glucose et les tannins condensés formés de proanthocyanidines.

4.2 Lignines

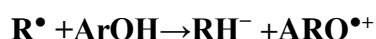
Ces composés de haut poids molécules constituent une classe importante de substances naturelles dans le règne végétal. Ils contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels qui résultent de la polymérisation oxydative de trois alcools phénylpropéniques, qui sont : les alcools *p*-coumarique, coniferique et sinapique.

5 Composés phénoliques et activité antioxydante

Les composés phénoliques sont de puissants antioxydants, ils empêchent les dommages créés aux biomolécules (protéines, acides nucléiques, lipides polyinsaturés et glucides) par le stress oxydant (Heleno et al., 2015). Leurs effets bénéfiques comprennent aussi des propriétés anti-inflammatoires, antidiabétiques, cardio-protectrices, neuro-protectrices, anti-tumorales et contre le vieillissement accéléré (Zhang et al., 2018). Il existe trois mécanismes principaux par lesquels les antioxydants exercent ces propriétés : le piégeage des radicaux libres, l'inhibition des enzymes génératrices des ROS et la chélation des métaux de transition (Valko et al., 2007). Dans le premier mécanisme, le radical libre (**R•**) peut éliminer un atome d'hydrogène de l'antioxydant (**Ar-OH**), qui devient un radical. Plus l'énergie de dissociation des liaisons O-H est faible, plus la réaction d'inactivation du radical libre est facile et donc plus l'action antioxydante est importante.



Ainsi, l'antioxydant peut donner un électron au radical libre, qui devient un radical cationique. Dans ce mécanisme, plus l'ionisation potentielle (IP) est faible, plus l'abstraction d'électrons est facile, ce qui signifie une plus grande activité antioxydante.



L'action antioxydante des phénols est établie par la relation structure-activité (SAR) (Bendary et al. 2013), y compris le nombre et les positions du groupe hydroxyle (-OH), la présence d'une double liaison (C2 =C3), la glycosylation et la présence de substituant dans les cycles (Wang et al., 2018).

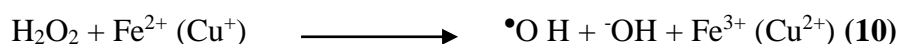
Les hydrogènes et les électrons sont donnés par les groupes hydroxyles, formant des radicaux stables. Ainsi, la position et l'indice d'hydroxylation sont en corrélation avec l'activité antioxydante des composés phénoliques. La présence de deux groupes hydroxyles dans le cycle suggère une amélioration de l'effet antioxydant, tandis que la présence de 3-OH

contribue clairement à une diminution de l'activité antioxydante. L'augmentation du nombre d'hydroxyles permet de conserver le noyau aromatique, ce qui peut constituer un lien avec le site actif de certaines enzymes (Wang et al., 2018).

L'existence d'une double liaison C2=C3 en conjugaison avec un groupe 4-carbonyle augmente également de manière significative l'activité antioxydante, car elle assure la planéité, l'expansion des électrons et le déplacement entre les cycles adjacents. Le groupe 4-carbonyle peut en outre induire un déplacement d'électrons par des effets de résonance, influençant la constante de dissociation des groupes hydroxyles et la stabilité des radicaux (Wang et al., 2018).

Quant à la glycosylation phénolique, les différentes formes ont des capacités différentes. La forme C-glycoside a démontré une plus grande capacité antioxydante par rapport à l'O-glycoside dans des essais chimiques (Wang et al., 2018). La glycosylation interfère également avec la planéité, la méthylation et le déplacement des électrons (Heim et al., 2002). On sait également que l'activité antioxydante des glycosides est plus faible que celle des aglycones correspondants, mais que la biodisponibilité des premiers est plus élevée, ce qui augmente l'activité antioxydante (Heim et al., 2002).

Les composés phénoliques peuvent aussi inhiber la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition (Fe^{2+} et Cu^+). Ces derniers possèdent de nombreuses fonctions biologiques, ils sont impliqués dans la synthèse des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant comme la catalase et la superoxyde dismutase. Cependant, ces métaux peuvent être responsables de la production du radical hydroxyle (OH^\bullet) en provoquant une réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) au cours de la réaction de Fenton (Heim et al., 2002; Pietta, 2000).



D'autre part, l'autoxydation des ions Fe^{2+} et Cu^+ est considérée comme une source de O_2^\bullet et du H_2O_2 . Les polyphénols, plus précisément les flavonoïdes, peut complexer ces ions sous une forme qui bloque leur activité oxydante en les séquestrant au niveau de différents sites.

Les polyphénols inhibent l'activité de nombreux systèmes enzymatiques impliqués dans la production des radicaux libres. Ils possèdent une forte affinité envers une grande variété d'enzymes (Havsteen, 2002), par des interactions de Van Der Waals (cycles aromatiques) et via des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques). Par exemple, les flavones et les flavonols (noyaux tricycliques plans et polarisables) possèdent la capacité de se lier avec plusieurs protéines globulaires, notamment des enzymes, des transporteurs et des récepteurs

(Dangles, 2012). Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes sont les plus susceptibles d'inhiber les enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques par la formation d'un complexe inhibiteur-enzyme et aussi par piégeage des espèces réactives de l'oxygène. Ils inhibent la xanthine oxydase, une enzyme hépatique qui est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Certains flavonoïdes possèdent la capacité d'inhiber des enzymes clés impliquées dans la respiration mitochondriale, comme la NADPH oxydase qui favorise la génération des radicaux libres, aussi ils sont considérés comme de puissants inhibiteurs des métalloenzymes lipoxygénases et les myéloperoxydases (Dangles, 2012).

6 Polyphénols et athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires et les pathologies ischémiques sont considérées parmi les maladies les plus fréquentes dans le monde. Elles sont causées par un dysfonctionnement endothélial qui favorise l'apparition de l'athérosclérose. Le principal facteur de risque est un régime alimentaire riche en acides gras sensibles à l'oxydation. Par contre, un régime riche en légumes, fruits et céréales est considéré comme une source d'antioxydants naturels comme les composés phénoliques. Ces derniers peuvent provoquer une réduction des maladies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux.

Les polyphénols réduisent la production de ROS en inhibant les oxydases, en réduisant la production de superoxyde, en inhibant la formation des lipoprotéines oxydées, en supprimant la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses, en réduisant l'agrégation plaquettaire et en améliorant le stress oxydant mitochondrial. La consommation de polyphénols inhibe aussi le développement de l'hypertension, du diabète sucré, de l'hyperlipidémie et de l'obésité (Cheng et al., 2017).

6.1 Dysfonctionnement endothélial

Le dysfonctionnement endothélial est souvent associé à une augmentation du stress oxydant (Suganya et al., 2016) et d'une altération de l'activité mitochondriale (Lum & Roebuck, 2001). Le stress oxydant peut modifier la transduction du signal endothélial et les facteurs de transcription régulés par le système redox provoquant ainsi une augmentation de la perméabilité endothéliale et l'adhésion des leucocytes (Davidson & Duchon, 2007), qui peut conduire à un processus pathologique d'athérosclérose (Flammer et al., 2012; Hadi et al., 2005). Certaines études ont montré que l'hydroxytyrosol et l'extrait phénolique de l'huile d'olive extra vierge pourraient inverser la diminution de la phosphorylation endothéliale de la NO synthase, les niveaux intracellulaires de NO, et l'augmentation de la synthèse d'ET-1

induites par la stimulation de la production de ROS avec des niveaux élevés de glucose et d'acide linoléique et oléique. En outre, ils pourraient également inverser les niveaux réduits de NO et l'augmentation des niveaux d'ET-1 avec des concentrations élevées de glucose et des acides gras libres (Storniolo et al., 2014). Ces résultats suggèrent l'effet protecteur des extraits phénoliques de l'huile d'olive sur le dysfonctionnement endothélial induit par l'hyperglycémie et les acides gras libres. Le chocolat noir à haute teneur en flavonoïdes peut améliorer la dilatation de l'artère brachiale et favorise l'augmentation des concentrations plasmatiques d'épicatechine chez les adultes en bonne santé (Engler et al., 2004). Les vins rouges et les raisins peuvent augmenter le niveau de GMP cyclique qui est le médiateur de NO qui est responsable de la relaxation des cellules musculaires lisses par la relaxation des vaisseaux sanguins et l'augmentation de l'activité biologique de NO.

6.2 Oxydation des LDL

L'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) est un processus complexe dans lequel la protéine et les lipides subissent tous deux des changements oxydatifs et forment des produits complexes. Le stress oxydatif et l'oxydation des LDL pourraient jouer un rôle essentiel dans l'apparition de l'athérosclérose (Steinberg, 2009; Steinberg et al., 1989; Steinberg & Witztum, 2010). Les études *in vitro* sur les composés phénoliques du vin rouge et les LDL ont montré que le vin rouge inhibe l'oxydation des LDL catalysée par le cuivre (Frankel et al., 1993). L'étude réalisée par Chen et ses collaborateurs a montré que les composés phénoliques des feuilles d'*Hibiscus sabdariffa* enrichis en (-)-épicatechine gallate régulent la voie autophagique, ce qui entraîne une réduction de l'oxydation des LDL induite par les lésions des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine et l'apoptose (Chen et al., 2017). Suzuki-Sugihara et al. ont découvert que les catéchines du thé vert sont incorporées dans les particules de LDL sous des formes non conjuguées après l'incubation de l'extrait de thé vert et réduisent l'oxydation des LDL (Suzuki-Sugihara et al., 2016).

6.3 Prolifération des cellules musculaires lisses

Les CML contribuent à la formation des lésions athérosclérotiques, leur prolifération et leur migration sont des événements critiques qui favorisent l'épaississement progressif de l'intima et le développement de la sclérose de la paroi artérielle. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) est l'agent chimiotactique et mitogène le plus puissant pour les CML au niveau des lésions athérosclérotiques. L'inhibition des signaux conduisant à la prolifération des CML et leur migration pourrait également être une conséquence de l'inhibition des récepteurs du PDGF- β par les polyphénols du vin rouge (Rosenkranz et al.,

2002). Les composés phénoliques de poids moléculaires différents, par exemple, les composants monomériques (anthocyanosides, catéchines et flavonoïdes) et les composants oligomériques proanthocyanidines, ont montrés des effets antiprolifératifs similaires (Dell’Agli et al., 2004). La migration des CML et l’activation de la métalloprotéinase-2 matricielle (MMP-2) sont liées à la formation de l’athérosclérose. Le ptérostilbène, un composé phénolique présent dans les myrtilles, empêche la migration des CML, et l’activation de la MMP-2 par la phosphorylation de la Erk1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) (H. C. Lin et al., 2015). La production des facteurs de l’inflammation induite par l’AngII et la prolifération des CML jouent un rôle essentiel dans la progression des plaques athérosclérotiques. L’activation de PPAR γ atténue efficacement l’inflammation induite par l’AngII et la production de ROS intercellulaires. La curcumine régule la baisse de l’expression de p47phox (une sous-unité clé de la NADPH oxydase), inhibe l’expression de l’IL-6 et du TNF- α , diminue la production de NO et inhibe la prolifération des CML en augmentant l’activité de PPAR γ et en diminuant le stress oxydatif (Li et al., 2017).

6.4 Processus inflammatoire

Les macrophages jouent un rôle clé dans l’athérogenèse par leur action pro-inflammatoire, qui implique la production d’IL-1 et de facteur de nécrose tumorale, et suite à des réponses adaptatives plus spécifiques médiées par les lymphocytes T (Moore & Tabas, 2011; Shimada, 2009). Les macrophages prétraités par les flavonoïdes du thé pourraient réduire l’oxydation des LDL à médiation cellulaire en diminuant la libération de superoxyde par les macrophages (Yoshida et al., 1999). L’acroléine est un aldéhyde insaturé extrêmement actif et est considéré comme un facteur proathérogène. L’exposition à l’acroléine augmente le stress oxydatif intracellulaire et stimule l’accumulation de cholestérol et de triglycérides par l’augmentation de leur biosynthèse et par la surexpression des principaux régulateurs de la biosynthèse des lipides cellulaires. L’acroléine montre aussi un changement significatif dans la composition du microbiote intestinal, dans lequel une augmentation significative de *Ruminococcaceae* et *Lachnospiraceae*, dont le genre *Coprococcus* était significativement et positivement corrélé avec les concentrations en lipides dans l’aorte, et les macrophages, et aussi la peroxydation lipidique a été noté. Ces effets proathérogènes de l’acroléine sur le sérum, l’aorte, les macrophages et le microbiote intestinal étaient substantiellement inhibés par le jus de grenade (Rom et al., 2017). Le jus de grenade riche en composés phénoliques inhibe la formation des cellules spumeuses. De plus, Sarkar et al. ont rapporté que l’acide ellagique l’activité du facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF) par

l'inhibition de la translocation nucléaire NF- κ B induite par le MIF (Sarkar et al., 2015). L'hydroxytyrosol, un composé phénolique antioxydant majeur de l'huile d'olive peut inhiber l'activité et l'expression de la MMP-9 (Matrix metallopeptidase 9) et de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) dans les monocytes activées via l'inhibition de la protéine kinase C alpha (PKC α) et la protéine kinase C bêta 1 (PKC β 1) (Scoditti et al., 2014).

6.5 Agrégation plaquettaire

Les plaquettes pourraient maintenir l'hémostase du système circulatoire (Faggio et al., 2017). Les principales voies d'activation plaquettaire impliquent la voie de l'acide arachidonique, la voie de l'adénosine diphosphate (ADP), la voie de la sérotonine et la voie de NO. L'action des radicaux libres sur les cellules est impliquée dans l'agrégation plaquettaire. Mattiello et ses collaborateurs ont comparé l'effet du jus de grenade (la variété de Wonderful) et celui de l'extrait riche en composés phénoliques de fruit de la grenade sur l'agrégation plaquettaire, la mobilisation du calcium, la production de thromboxane A2 et la formation du peroxyde d'hydrogène induite par le collagène et l'acide arachidonique. Les résultats suggèrent que le jus et l'extrait phénolique de grenade ont provoqués une réduction de l'agrégation plaquettaire (Mattiello et al., 2009). Ces résultats ont démontré que les effets bénéfiques de la grenade sur la santé cardiovasculaire peuvent en partie être liés à la capacité des polyphénols à inhiber la fonction plaquettaire. Il a été démontré aussi que le cacao et le chocolat noir préviennent l'agrégation plaquettaire en réduisant l'activation membranaire des glycoprotéines IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) induite par l'ADP, l'adrénaline et l'épinéphrine, l'expression membranaire de la P-sélectine induite par l'ADP et l'activité de la phospholipase A2 (PLA2) et de la cyclooxygénase (Pearson et al., 2002; Rein et al., 2000; Rull et al., 2015). En outre, le chocolat noir peut inhiber la fonction plaquettaire en réduisant le stress oxydatif chez les fumeurs. L'activation des plaquettes par ROS, 8-iso-PGF2 α (8-iso-prostaglandin F2 α), et NADPH oxydase 2 (NOX2) a été significativement réduite après la consommation de chocolat noir (Carnevale et al., 2012).

7 *Punica granatum* L. (espèce étudiée)

La culture et la consommation de la grenade (*Punica granatum*. L) remontent à au moins 3000 avant J-C. La grenade (*Punica granatum* L.) est un ancien arbuste fruitier à feuilles caduques, l'une des deux espèces de la famille des Punicaceae. *Punica granatum* est originaire de l'Himalaya, dans le nord de l'Inde, jusqu'aux Iran, mais il a été introduit et cultivé depuis l'Antiquité dans toute la région méditerranéenne. Historiquement, la grenade a été un symbole de vie et de fertilité. En outre, les différentes parties de la grenade ont été

utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies. Les fruits de la grenade possèdent une activité antibactérienne et antivirale qui permet d'éliminer certains parasites intestinaux (Dell'Agli et al., 2009), les graines et l'écorce des fruits à traiter la diarrhée (Das et al., 1999; Qnais et al., 2007), les fleurs à diminuer le risque de développer un diabète (Banihani et al., 2013), l'écorce et les racines à arrêter les saignements et les ulcères buccaux (Bhowmik et al., 2013), et les feuilles pour contrôler l'inflammation et traiter les troubles du système digestif (Bhowmik et al., 2013). En raison de ses bienfaits pour la santé humaine, la grenade a suscité un grand intérêt scientifique et un engouement auprès des consommateurs ces dernières années. Aujourd'hui, la grenade est utilisée comme ingrédient d'aliments fonctionnels et comme complément alimentaire sous diverses formes, comme les fruits et jus frais, les capsules et comprimés contenant des extraits de différentes parties de la grenade, le thé infusé à partir de feuilles de grenade, la confiture, la gelée, le jus et le vin produits à partir de fruits de grenade, ainsi que les épices préparées à partir de graines séchées.

Cultivé depuis plusieurs millénaires au Maroc et considéré, jusqu'à il y a quelques années, comme une espèce fruitière d'intérêt secondaire, le grenadier prend de plus en plus d'ampleur ces dernières années. Cet engouement se reflète par une intensification des plantations dans différentes régions du pays, par l'intérêt qu'il suscite auprès des chercheurs, des techniciens et agriculteurs, et par une demande soutenue de la part des consommateurs. Fruit du grenadier (*Punica Granatum* L.), espèce vivante entre les tropiques et en zone méditerranéenne, la grenade est très appréciée dans les pays du Maghreb tant pour ses qualités gustatives, que ses bienfaits pour les multiples vertus thérapeutiques, aussi bien en médecine traditionnelle que dans la recherche médicale. Deux groupes de variété sont cultivées au Maroc : les grenades à pépins doux, consommées en frais (Sefri, Zhéri, Kharazi, Laroussi...) et les grenades acides à pépins durs, destinés à la transformation (Wonderful, Negro, Monstruoso,...). La grenade « Sefri » d'Ouled Abdellah (**Figure 16**), région de Béni Mellal-Khénifra, qui doit son nom à la couleur jaune de ses écorces, jouit d'une notoriété nationale en raison des caractéristiques organoleptiques de ses fruits, typique à la région. Malgré ses bénéfiques, ce fruit reste peu étudié au Maroc.



Figure 16: Fruits, fleurs et arbre du grenadier « Sefri » de la région d'Ouled Abdellah.

8 Caractérisation phytochimique du grenadier

8.1 Les ellagitanins, les gallotanins et leurs dérivés

Les tanins hydrolysables sont parmi les substances phytochimiques les plus abondants dans la grenade. On peut les regrouper en ellagitanins et en gallotanins en fonction des différents acides phénoliques qui sont estérifiés en une molécule de polyol cyclique (il s'agit souvent d'une molécule de glucose). L'écorce de grenade est riche en tanins hydrolysables, en particulier en ellagitanins. Les isomères de la punicalagine constituent jusqu'à 85% des tanins totaux dans les extraits de l'écorce de grenade (Seeram et al., 2005). Des ellagitanins et leurs dérivés glycosidiques ont également été trouvés dans les pelures de fruits et d'autres parties de grenade. Bien que les isomères de la punicalagine représentent les principales ellagitanins dans les racines de la grenade, ils s'accumulent à des concentrations bien plus faibles dans les racines que dans l'écorce (Ono et al., 2012).

8.2 Flavonoïdes

L'écorce, les arilles et le jus de grenade sont riches en flavonoïdes de structures diverses, notamment les aglycones et les glycosides de chalcones, les flavanones, les flavones, les flavonols, les anthocyanines, les flavan-3-ols et les procyanidines. Deux flavones, la lutéoline et la triacétine, ont été trouvées dans un extrait méthanolique de fleurs de grenade (Xie et al., 2008). Les deux flavanones, le punicaflavanol et le xyloside ont été identifiés dans le fruit par RMN (Bagri et al., 2010), tandis que l'hoverichoside C (un glucoside de l'auro nol) et la phloridzine (un glycoside attaché à une dihydrochalone : la phlorétine) ont été identifiés par Spectroscopie Infrarouge (IR) dans les fleurs de grenade (Yuan et al., 2013). Comme d'autres plantes, les feuilles de grenade accumulent également des concentrations élevées de glycosides de flavone (par exemple, l'apigénine et la lutéoline) (Nawwar et al., 1994). Les analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur à barrette de photodiodes (HPLC)-DAD ont révélé que deux isoflavones, la génistéine et la daidzéine,

ainsi qu'un flavonol (la quercétine), sont présents dans les graines de grenade (Garima & Akoh, 2009; Moneam et al., 1988).

8.3 Les lignanes

Les lignanes végétales sont un groupe de phytoestrogènes qui peuvent être métabolisés en lignanes par le microbiote intestinal. Des lignanes de type furofurane, dibenzylbutane et dibenzylbutyrolactone ont été identifiées dans les différentes parties de la grenade par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC)-ms, tandis que l'isolariciresinol est la lignane la plus abondante dans l'écorce de grenade (Ulrike Anna Fischer et al., 2012). En plus des lignanes mentionnés ci-dessus, le pomegralignan, un glycoside de neo-lignan de type dihydrobenzofurane, a été découvert dans les arilles et l'écorce de grenade (Ito et al., 2014). Un autre neo-lignan, le punnicatannin C, a été isolé à partir de fleurs de grenade et sa structure a été identifiée par analyse RMN (Yuan et al., 2013).

8.4 Acides gras et lipides

Les acides gras (AG) à moyenne (C6, C8, C10 et C12), longue (C14, C16, C18 et C20) et très longue chaînes (C22 et C24) ont été identifiés dans les graines, le jus et les fruits de grenade par analyse CG-DIF (Chromatographie en Phase Gazeuse avec Détecteur à Ionisation de Flamme), MS (Spectrométrie de Masse) ou RMN (Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire). L'acide punique polyinsaturé (acide octadécatriénoïque 9Z, 11E, 13Z) représente l'acide folique le plus abondant dans les graines de grenade, représentant plus de 60 % de l'huile de graines. Les triacylglycérols contenant l'acide (9E, 11Z, 13E)-octadécatriénoïque, l'acide 3-O-octadéc-2-énoïque, l'acide (9Z, 11E, 13Z)-octadécatriénoïque et l'acide (8Z, 11Z, 13E)-octadécatriénoïque sont présents dans les graines de grenade et leurs structures ont été déterminées par RMN (Fatope et al., 2002). De plus, un glycosphingolipide N-palmitoyl cérébroside a été identifié dans l'huile de graines par analyse CCM (Chromatographie sur Couche Mince) et GC-FID (Verardo et al., 2014).

8.5 Acides organiques et acides phénoliques

Les principaux acides organiques du jus de grenade sont l'acide citrique et l'acide malique (Mena et al., 2012). Le jus de grenade contient également de l'acide ascorbique, de l'acide fumarique, oxalique, quinique, succinique et de l'acide tartrique, dont certains ont également été identifiés dans les feuilles, l'écorce et les graines du fruit (Garima & Akoh, 2009; Melgarejo et al., 2000; Mena et al., 2012). Les acides phénoliques, principalement les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, sont généralement présents dans l'écorce, les jus et les fleurs de grenade. En outre, l'acide 7,8-dihydroxy-3-carboxyméthyl

coumarine-5-carboxylique, a été identifié dans les fleurs de grenade par RMN (Yuan et al., 2013).

9 Rôle de la grenade dans la nutrition et la santé humaine

Les fruits, en général, jouent un rôle majeur dans le maintien d'une alimentation équilibrée. Ils fournissent de nombreux macro- et micronutriments, ainsi que des composés bioactifs qui sont bénéfiques pour la santé. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont montré l'importance de la consommation de fruits dans la prévention des risques liés à la santé, ainsi que des campagnes en faveur de l'intégration des fruits dans l'alimentation des enfants. Les effets bénéfiques de la grenade sur la santé ont été attribués à la large gamme de substances phytochimiques qu'elle contient. Comme nous l'avons déjà décrit, le principal produit phytochimique de la grenade est constitué de polyphénols, principalement des ellagitanins et des anthocyanes hydrolysables (Viuda-Martos et al., 2010). Cependant, il a été démontré qu'il existe un effet synergique entre les composés qui augmente encore leur bioactivité. Par exemple, la quercétine et l'acide ellagique présentent de meilleures propriétés inhibitrices dans la croissance de cellules cancéreuses par rapport à leurs effets seules (Shukla et al., 2008). De nombreuses études ont été menées sur les effets bénéfiques pour la santé, en plus de la valeur nutritionnelle, de la grenade et de ses constituants. Des résultats ont renforcé l'intérêt porté à ce fruit spécifique au cours des dernières années. La grenade, étant riche en composés bioactifs comme les polyphénols, a montré de nombreuses propriétés bénéfiques liées à la santé, telles que les activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antihypertensives, grâce à des études *in vivo* et *in vitro*. On considère que les propriétés du fruit sont principalement dues à la présence de punicalagine et, dans une moindre mesure, à d'autres métabolites, tels que les flavonols et les anthocyanes (Syed et al., 2007). Plusieurs études ont mis en évidence la contribution de la grenade dans le traitement du cancer, du diabète et des maladies cardiovasculaires.

9.1 Études *in vitro*

Plusieurs études *in vitro* ont été menées en utilisant principalement du jus et des extraits de grenade afin d'étudier leurs effets bénéfiques pour la santé.

L'une des propriétés les plus importantes de la grenade et de ses dérivés est leur effet sur le microbiote intestinal et leur utilisation comme agents antimicrobiens. Il est bien connu que les ellagitanins, le groupe de polyphénols le plus abondant dans la grenade, sont hydrolysés en acide ellagique dans l'intestin avant d'être métabolisés par le microbiote du côlon pour former l'urolithine A et B (Finegold et al., 2014). Ce phénomène a été associé au pouvoir prébiotique

de la grenade et de ses produits. Des cultures des souches de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* se sont avérées capables d'utiliser l'acide ellagique et l'acide glycosyl ellagique. Dans une étude similaire, le jus et les extraits de grenade ont été utilisés dans des cultures des selles *in vitro* et ont prouvé qu'ils augmentaient la croissance des *Bifidobactéries* et des *Lactobacilles* tout en inhibant simultanément la croissance du groupe *Bacteroides fragilis*, *Clostridia* et *Enterobacteriaceae* (Li et al., 2015).

Les extraits de grenade ont également été évalués pour leur activité anticancérogène contre de nombreux types de cancer (Adaramoye et al., 2017; Aqil et al., 2012; Li et al., 2016). Plus précisément, il a été démontré que les extraits de grenade bloquent l'activité du facteur nucléaire kappa B (NF-κB) dans un modèle de cancer de la prostate (Deng et al., 2017) et de carcinome des cellules rénales (An et al., 2015) *in vitro*. Par conséquent, les extraits de grenade peuvent être utilisés comme complément alimentaire pour traiter les patients atteints de petites tumeurs rénales localisées et accidentellement identifiées, ce qui peut permettre d'éviter la néphrectomie (An et al., 2015). Les extraits d'écorce de grenade et la punicalagine, ont montré une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses de la prostate et une activité antiproliférative par l'induction de l'apoptose (Adaramoye et al., 2017; Deng et al., 2017). En outre, des études *in vitro* ont révélé que la punicalagine induit la mort cellulaire des cellules de carcinome papillaire de la thyroïde (Yao et al., 2017), inhibe la prolifération cellulaire dans une lignée cellulaire de carcinome du poumon (Li et al., 2016) et exerce une forte activité anti-proliférative contre les lignées cellulaires de cancer du poumon, du sein et du col de l'utérus (Aqil et al., 2012).

Les composés phénoliques de la grenade peuvent être utilisés comme antioxydants naturels pour des applications cosmétiques pour la santé de la peau. Une étude *in vitro* a montré leurs effets protecteurs contre le stress oxydant induit par H₂O₂ et la cytotoxicité dans les cellules HaCaT des kératinocytes humains (Liu et al., 2019). En outre, les produits à base de grenade (jus, extrait et huile) qui sont dérivés du reste de la matière après le pressage des fruits de grenade pour la production de jus ont présenté des effets photochimiques préventifs (Afaq et al., 2009). Plus spécifiquement, il a été démontré que les produits de grenade inhibent les dommages causés à l'ADN et aux protéines par les UVB, l'augmentation des niveaux d'antigène nucléaire et de tropoélastine des cellules proliférantes ainsi que la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire dans la peau.

Ces dernières années, l'obésité est devenue un problème de santé majeure et plusieurs études ont été consacrées à ce sujet. Le jus de grenade et certains composants spécifiques,

comme l'acide ellagique et la punicalagine, ont présenté la capacité d'inhiber les amines oxydases, l' α -glucosidase, la dipeptidyl peptidase-4, la lipase, l'accumulation de triglycérides ainsi que de diminuer la lipogénèse et stimuler la lipolyse dans les cellules adipeuses. Ces résultats ont montré le grand pouvoir du jus de grenade et de ses composants pour être utilisé comme aliment fonctionnel (alicament) pour la prévention des maladies qui sont associées à l'obésité, au diabète et aux dyslipidémies (Les et al., 2017, Les et al., 2018). En outre, il a été démontré que l'extrait de jus de grenade et les ellagitanins inhibent l'activité de la glucosidase α *in vitro* et réduisent la digestibilité de l'amidon dans des conditions gastro-intestinales simulées, confirmant ainsi le grand potentiel du jus de grenade pour améliorer l'hyperglycémie postprandiale, qui est liée au diabète de type II (Bellesia et al., 2015).

Plusieurs études ont proposé l'utilisation de la grenade, et en particulier de son dérivé la punicalagine et des urolithines, comme stratégie nutritionnelle potentielle pour ralentir la progression de troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer (DaSilva et al., 2019). Les urolithines inhibent la neuro-inflammation (DaSilva et al., 2019), tandis que la punicalagine inhibe les troubles de la mémoire induits par les lipopolysaccharides par des mécanismes anti-inflammatoires (Kim et al., 2017).

Les extraits de grenade stimulent la différenciation ostéoblastique (Kim & Choi, 2009), tandis que la punicalagine atténue la différenciation des ostéoclastes *in vitro* (Iwatake et al., 2015); le jus ou les extraits de grenade pourraient donc être utiles comme agents pour le traitement de l'ostéoporose. En outre, la consommation régulière de grenade peut être bénéfique pour les tissus osseux (Kim & Choi, 2009).

9.2 Études *in vivo*

La grenade et surtout ses extraits ont attiré l'attention en raison de leurs nombreux bienfaits pour la santé, dont certains sont associés à l'obésité. Plusieurs études sur le modèle animal ont démontré que les extraits de grenade peuvent inhiber l'inflammation et l'accumulation du cholestérol LDL (lipoprotéines de basse densité) chez des souris rendues obèses par un régime hypercalorique (Neyrinck et al., 2013; Rodriguez et al., 2015) et peuvent réduire la peroxydation des lipides hépatiques et la concentration sérique en glucose chez les rats témoin, en plus d'améliorer le contrôle de la glycémie et d'augmenter le nombre relatif de cellules bêta chez les rats diabétiques dont l'alimentation est riche en alloxan (Parmar & Kar, 2007; Parmar & Kar, 2008). Dans une étude récente, la combinaison d'extraits de grenade avec de l'inuline a conduit à une amélioration des effets hypocholestérolémiantes (Yang et al., 2018). De plus, cette diminution du taux de cholestérol

semble être liée à une stimulation de la synthèse des acides biliaires. En outre, la punicalagine réduit l'accumulation de triglycérides et de cholestérol induite par l'alimentation riche en graisses chez des rats obèses grâce à l'activation de la protéine kinase activée par l'adénosine mono-phosphate (AMPK) (Cao et al., 2015). Enfin, les extraits de feuilles de grenade peuvent inhiber l'absorption des lipides et réduire les triglycérides sanguins et le cholestérol total chez des souris hyperlipidémiques en inhibant l'activité de la lipase (George et al., 2019).

La supplémentation en grenades peut ralentir la progression des troubles cognitifs et comportementaux dans la maladie d'Alzheimer (Subash et al., 2015), tandis que les extraits de grenade ont des effets anti-inflammatoires et antioxydants dans le cas des lésions hépatiques aiguës provoquées par une ponction (Makled et al., 2016) ; il a également été démontré qu'ils protègent contre l'inflammation et l'apoptose provoquées par l'arsenic dans les cellules hépatiques chez la souris (Choudhury et al., 2016). Un autre produit important de la grenade, qui présente plusieurs avantages pour la santé, est constitué par les polysaccharides de la pelure de grenade (rhamnose, acide glucuronique, acide galacturonique, glucose et xylose), qui peuvent être utilisés dans une immuno-thérapie efficace ou comme moyen alternatif pour réduire l'immunosuppression induite par la chimiothérapie ; ils peuvent également être utilisés comme immunostimulants pour les industries alimentaire et pharmaceutique (Wu et al., 2019). Plusieurs études ont montré que les polysaccharides de la pelure de grenade peuvent renforcer l'effet immunomodulateur, induit par la cyclophosphamide, chez des souris immunodéprimées (Wu et al., 2019), présenter un fort effet protecteur contre les lésions hépatiques induites par la CCl₄ chez la souris (Zhai et al., 2018) et, à faible dose, atténuer les symptômes de l'hypersensibilité, ce qui suggère qu'ils peuvent avoir des effets bénéfiques contre la dermatite allergique chez l'homme (Nagano & Ito, 2018).

9.3 Études chez l'Homme

L'importance des effets bénéfiques de la grenade pour la santé a été évaluée par plusieurs études chez l'Homme. La consommation de jus de grenade pendant une période de huit semaines a montré des effets bénéfiques sur la pression sanguine, les triglycérides sériques, le c-LDL, le stress oxydant et l'inflammation chez les patients hémodialysés (Barati et al., 2020). Chez les patients atteints de diabète de type 2, une consommation de 1,5 ml/kg de poids corporel a réduit le niveau d'érythropoïétine sérique après trois heures (Banihani et al., 2019), tandis qu'une consommation de 200 ml/jour pendant six semaines a réduit la pression artérielle systolique et diastolique sans aucun effet sur le profil lipidique (Sohrab et al., 2019).

De plus, la consommation quotidienne de jus de grenade (230 ml) a été associée à la stabilisation de la capacité à apprendre des informations visuelles sur une période de 12 mois (Siddarth et al., 2019). La consommation de jus de grenade a également été proposée aux athlètes, et une étude sur une période de 21 jours a montré une régulation à la baisse des niveaux de malondialdéhyde et de carbonyles, et donc une diminution des dommages oxydatifs causés par l'exercice physique (Fuster et al., 2016). Enfin, le jus de grenade a été associé à une réduction de l'inflammation, des lésions musculaires et à une augmentation du taux de plaquettes sanguines chez les personnes en bonne santé (Achraf et al., 2018). Une supplémentation de 30 jours avec des extraits de grenade chez des personnes en surpoids et obèses a eu des effets bénéfiques sur le poids corporel, le glucose sérique, l'insuline, les triglycérides, le cholestérol total, le C-LDL, le C-HDL, tout en agissant comme un agent anti-inflammatoire, en réduisant les biomarqueurs inflammatoires et de peroxydation lipidique (Hosseini et al., 2016). Une supplémentation de huit semaines avec des extraits de pelure de grenade a diminuée la pression sanguine systolique et diastolique chez les patients atteints de diabète de type 2 et a également présentée un pouvoir hypolipémiant, hypoglycémiant et antioxydant (Grabež et al., 2019). Enfin, des études cliniques menées chez des patients diabétiques de type 2 avec de l'huile de pépins de grenade ont permis de réduire les taux de glycémie à jeun, d'interleukine-6 et de TNF- α ; cependant, aucun changement significatif n'a été observé dans les profils insulinaire et lipidique (Khajebishak et al., 2019; Khajebishak et al., 2019).

11. Conclusion

Du fait de l'importance du dysfonctionnement endothélial, du stress oxydatif, de l'hypercholestérolémie et du rôle des espèces réactives de l'oxygène pro-oxydantes dans l'apparition de la maladie d'athérosclérose, les composés phénoliques, qui possèdent de fortes capacités antioxydantes, représentent un choix thérapeutique important (Cullen et al., 2020; Wei et al., 2021). En plus de leurs capacités antioxydantes, il est probable que certains composés phénoliques sont impliqués dans l'activation de certains mécanismes intracellulaires encore mal compris, ce qui aboutit à l'activation de différentes voies de signalisation cellulaire (Di Pietro et al., 2020; Leri et al., 2020; Luo et al., 2021; Restani, 2020). Avec plusieurs centaines de milliers d'espèces différentes, les ressources thérapeutiques végétales constituent un immense gisement de molécules actives qui ne cesse de donner de nouveaux médicaments au fur et à mesure que la compréhension des mécanismes pathologiques et du fonctionnement de l'organisme humain évolue. Les plantes

représentent donc un réservoir unique de molécules aux vertus thérapeutiques que les chercheurs n'ont pas cessé de l'explorer.

Les régimes alimentaires à base de polyphénols ou riches en composés phénoliques présentent des effets antioxydants et anti-inflammatoires (Cullen et al., 2020; Wei et al., 2021; Zhou et al., 2021). Les polyphénols réduisent la production des espèces réactives de l'oxygène en inhibant les oxydases, en réduisant la production de superoxyde, en inhibant la formation des LDL oxydées, en inhibant la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses, en réduisant l'agrégation plaquettaire et en améliorant le stress oxydatif mitochondrial (Cullen et al., 2020; Wei et al., 2021). La consommation de polyphénols inhibe également l'apparition de l'hypertension, du diabète sucré, de l'hyperlipidémie et de l'obésité (Da Porto et al., 2021; Di Lorenzo et al., 2021; Feldman et al., 2021; Godos et al., 2019; Koch, 2019; Mthembu et al., 2021). Cependant, conformément aux preuves *in vitro* et *in vivo*, des études cliniques bien conçues sont nécessaires pour confirmer l'efficacité des polyphénols dans le traitement des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux liés à l'athérosclérose.

C'est dans ce contexte que se sont situés mes travaux de recherche, portant sur le grenadier *Punica granatum* L., la variété « Sefri » d'Ouled Abdellah, région de Béni Mellal-Khénifra. Le but de cette thèse était d'étudier l'impact de matrices riches en composés phénoliques extraits de cette plante, dans un modèle simplifié de dysfonction endothéliale. Des études *in vitro* visant à étudier leur capacité à empêcher l'oxydation des LDL, ou à contrer les effets cytotoxiques et inflammatoires des LDL oxydées ont tout d'abord été réalisés, puis nous avons testé les capacités antiathérogènes chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique et hypocholestérolémiant capable d'augmenter le statut inflammatoire des plaques d'athérosclérose.

DEUXIÈME PARTIE :
DÉMARCHE SCIENTIFIQUE

Contexte

Il est bien démontré aujourd'hui qu'une augmentation du taux des c-LDL, VLDL, du cholestérol total ainsi qu'une diminution du taux de HDL, sont étroitement liées à un risque accru de maladies cardiovasculaires. Cependant, le développement de stratégies thérapeutiques permettant de renverser cette situation, représente l'objectif principal des approches thérapeutiques de prévention et de traitement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Catapano et al., 2019).

Il y a des milliers d'années, les plantes médicinales ont joué un rôle essentiel dans le traitement et la prévention des maladies humaines, elles sont considérées comme la base des systèmes de médecine traditionnelle (Chaachouay et al., 2021). En dépit du développement énorme dans le domaine pharmaceutique, les centres de recherche et les sociétés pharmaceutiques ont élargi leurs programmes de recherche par la synthèse et le criblage de nouvelles molécules naturelles dans le but de découvrir et de développer de nouveaux médicaments à base de plantes. L'ethnobotanique et l'éthnopharmacognosie ont réussi depuis une vingtaine d'années à mettre au point une méthodologie scientifique utilisée comme guide pour la recherche et la découverte des différentes ressources et classes médicamenteuses.

Dans le cadre de la recherche de produits naturels, il y a eu un intérêt croissant ces dernières décennies pour l'étude de composés phénoliques et leurs utilisations dans le traitement de plusieurs pathologies à cause de leurs effets thérapeutiques potentiels (Feldman et al., 2021). Des études à la fois *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que certains composés phénoliques naturels et leurs dérivés peuvent protéger le corps humain contre les pathologies liées au stress oxydatif comme l'athérosclérose (Cullen et al., 2020; Feldman et al., 2021; Wei et al., 2021). Cet effet protecteur est principalement lié au pouvoir antioxydant des aliments, qui se caractérise par la présence de substances bioactives (anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancérogènes..) notamment des polyphénols dans leur composition (Cullen et al., 2020; Feldman et al., 2021; Saso et al., 2020; Wei et al., 2021). En outre, l'extraction d'un grand nombre de substances naturelles à potentiel thérapeutique reste un défi, et le développement de nouvelles approches biotechnologiques et de la synthèse organique complète reste nécessaire. Malgré ces lacunes, les recherches actuelles suggèrent que les substances naturelles sont considérées comme source majeure de nouveaux médicaments dans l'avenir (Atanasov et al., 2021). Compte tenu de la variété et de la

complexité des processus d'oxydation, la régulation pharmacologique du stress oxydatif regroupe de nombreuses stratégies thérapeutiques (Saso et al., 2020).

Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la réponse du système antioxydant, et il est impliqué dans la pathogenèse d'un grand nombre de maladies, y compris les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives et le cancer (Saso et al., 2020). Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont considérées comme l'une des principales causes de décès dans les pays occidentaux (OMS, 2018). Au total, 17,5 millions de personnes meurent chaque année de MCV, ce qui correspond à un taux estimé de 31 % de tous les décès dans le monde, et cela pourrait rester le cas au moins pour les 15 à 20 prochaines années (OMS, 2018). La principale cause du développement des MCV, l'athérosclérose, a une étiologie multifactorielle, progressive et chronique causée par une homéostasie déséquilibrée des lipides sanguins et du statut oxydatif (Pahwa & Jialal, 2021). Ces déséquilibres sont responsables d'un processus de longue durée qui aboutit à l'accumulation, dans l'intima de la paroi artérielle, de cellules spumeuses, ce qui correspond à la première étape de la formation de la plaque d'athérome (Fledderus et al., 2021; Poznyak et al., 2020; Woo et al., 2021; Zhao et al., 2021). Divers facteurs, tels que l'inflammation chronique, peuvent conduire à la rupture de la plaque jusqu'à l'obstruction des vaisseaux provoquant ainsi une ischémie cardiaque ou cérébrale (Bentzon et al., 2014).

L'accumulation de c-LDL dans l'intima artérielle étant une étape cruciale dans l'accumulation des cellules spumeuses et la progression des lésions athérosclérotiques (Fledderus et al., 2021; Poznyak et al., 2020; Woo et al., 2021; Zhao et al., 2021), ils semblent être une cible intéressante à étudier pour la prévention. La principale voie dont l'organisme est capable d'éliminer l'excès de cholestérol est le transport inverse du cholestérol médié par les lipoprotéines de haute densité (HDL-C) (Kontush, 2020; Trajkovska & Topuzovska, 2017). Ce mécanisme, basé sur la capacité d'efflux du cholestérol, stimule l'élimination du cholestérol des tissus périphériques, y compris la paroi artérielle, et il a été récemment établi qu'il s'agit d'un facteur prédictif du risque cardiovasculaire (Qiu et al., 2017). En conséquence, la stimulation de l'efflux du cholestérol pourrait ralentir la formation et le développement de la plaque athéromateuse (Hutchins & Heinecke, 2016).

En tant que stratégie de première ligne dans la prévention primaire des MCV, les modifications du mode de vie, et notamment un régime alimentaire sain, serait d'un grand intérêt. D'un point de vue nutritionnel, il a été supposé qu'une consommation élevée de

composés phénoliques, les micronutriments bioactifs les plus abondants dans tous les fruits et légumes, est fiable en termes des divers effets sur la santé qui leur sont attribués (Tresserra-rimbau et al., 2014).

Ces dernières années, de nombreuses études *in vivo*, ainsi que des essais cliniques, ont montré les effets bénéfiques des composés phénoliques dans la prévention primaire des maladies cardiovasculaires, soit en association avec des médicaments, tels que les statines, soit avec un régime alimentaire contrôlé (Zanotti et al., 2015). Au-delà de leurs effets antioxydants et anti-inflammatoires très étudiés, des recherches récentes ont mis en évidence la capacité modulatrice des polyphénols sur plusieurs voies de signalisation cellulaire, et, en particulier, sur la modulation du métabolisme lipidique cellulaire (Cullen et al., 2020; Feldman et al., 2021; Millar et al., 2017; Wei et al., 2021; Zanotti et al., 2015). Certains flavonoïdes ont montré des effets préventifs sur le développement de l'athérosclérose grâce à leur capacité à réguler le transport inverse du cholestérol (Millar et al., 2017). Les essais précliniques utilisant des modèles de culture cellulaire et animale, ont montré que les flavonoïdes alimentaires influencent plusieurs fonctions des HDL, comme l'efflux de cholestérol et les capacités antioxydantes. Les études *in vitro* ont montré que les anthocyanidines peuvent favoriser l'efflux de cholestérol et la formation de HDL via l'activation du récepteur LXR (liver X receptor) et la régulation des transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Jia et al., 2013; Wang et al., 2012; Wang et al., 2012). La cyanidine peut agir comme un agoniste de LXR- α sans avoir d'effets sur l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes (Jia, Hoang, et al., 2013), ce qui peut être dû à une activité supplémentaire en tant que ligand de PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (Jia et al., 2013b). Le Cyanidin-3-G (C3G) à des concentrations élevées (50 μ M) a augmenté l'efflux de cholestérol des cellules rénales HK-2 (human kidney 2) (Du et al., 2015) et endothéliales (Wang et al., 2012). Dans les deux modèles, ces effets étaient associés à une augmentation de l'expression et de l'activation de LXR α . Les études sur les macrophages ont montré des résultats similaires. Des macrophages péritonéaux de souris traités avec du C3G et du peonidin-3-glucoside (1-100 μ M) ont montré une augmentation dose-dépendante de l'efflux de cholestérol vers l'apoA-I, qui a été attribuée à une induction de la voie PPAR γ -LXR α -ABCA1 (Xia et al., 2005). À des concentrations beaucoup plus faibles (jusqu'à 1 μ M), il a également été démontré que le métabolite de l'anthocyanine, le PCA (acide protocatéchuique), augmente l'efflux de cholestérol des macrophages vers l'apoA-I (Wang et al., 2012). Wang et al (Wang et al., 2012) ont montré que l'administration de C3G (50

mg/kg/poids corporel/j) à des souris apoE^{-/-} pendant 4 semaines provoque une augmentation des concentrations sériques de cholestérol HDL et d'apoA-I, réduisant ainsi le développement de l'athérosclérose. Les anthocyanines semblent également influencer d'autres aspects de la fonction des HDL, comme l'activité de la paroxonase (PON1). Il a été démontré que la supplémentation d'un extrait de sureau noir riche en anthocyanines (200 mg d'anthocyanines/kg de poids corporel) pendant 6 semaines augmentait l'expression de l'ARNm de la LCAT hépatique et de la PON1 et l'activité sérique de la PON1 chez les souris apoE^{-/-} (Farrell et al., 2015). De plus, une supplémentation en extrait d'airelle noire pendant 4 semaines a augmenté l'activité de la PON1 plasmatique chez des souris apoE^{-/-} soumis à un régime riche en graisses saturées et en cholestérol (15 % de graisses totales, 9 % de graisses saturées et 0,2 % de cholestérol en poids) (Kim et al., 2013). L'airelle noire contient des quantités importantes d'acides phénoliques et de proanthocyanidines, qui peuvent également avoir contribué à cet effet (Kim et al., 2013).

En effet, les différentes cibles moléculaires associées aux voies de signalisation intracellulaires associées à la modulation du statut redox fournissent une alternative ou un complément à la régulation du stress oxydatif et la prévention de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Descamps et al., 2006). Un intérêt tout particulier est mis sur le potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et antiathérogène du grenadier (*Punica granatum* L.), une plante médicinale appartenant à la famille des *punicaceae*. L'efficacité des propriétés antioxydantes du grenadier dans le cadre de la thérapeutique préventive de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires est développée tout au long de ce travail de thèse.

Objectifs de la thèse

L'objectif principal de mon sujet de thèse consiste en la valorisation des produits de la grenade, et plus particulièrement la variété « Sefri » d'Ouled Abdellah, région de Béni Mellal-Khénifra. Au cours de ce travail de thèse nous avons dans un premier temps évalué *in vivo* l'effet hypolipémiant et hypoglycémiant des extraits phénoliques du grenadier (Écorce et Arilles). Au terme de cette étude, les paramètres biochimiques (cholestérol total, triglycérides, cholestérol HDL, cholestérol LDL et glycémie) ont été dosés ainsi que des coupes histologiques sur le foie et l'aorte thoracique des différents groupes de rats ont été réalisées. Au terme des résultats obtenus nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'actions impliqués principalement dans les effets hypolipémiants et antiathérogènes des composés phénoliques. Ainsi une deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'étude de l'effet de composés phénoliques dans la prévention des lipoprotéines contre le phénomène de

peroxydation, l'activité paraoxonase 1 ainsi que la régulation de l'homéostasie du cholestérol aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Un intérêt très particulier a été porté sur l'effet de ces composés sur le processus du transport inverse du cholestérol en utilisant une technique de radio-marquage ainsi que sur la régulation des voies moléculaires impliquées dans ce processus, à savoir l'ABCA1, ABCG1, SR-B1 et LXR. Ces transporteurs constituent une cible thérapeutique prometteuse par rapport aux composés phénoliques du grenadier (Sefri). Afin d'établir une relation cause-effet, une étude de caractérisation chimique de ces composés phénoliques a été réalisée moyennant un système HPLC-DAD et qui a révélé que cette fraction phénolique du grenadier (Sefri) était particulièrement riche en Punicalagine. Ainsi l'effet de la punicalagine a été étudié sur les différents aspects liés au développement du processus athérogène. Ainsi, l'effet de la Punicalagine a été étudié sur le processus du transport inverse du cholestérol au niveau d'une lignée de macrophages (J774), sur les différentes voies moléculaires impliquées dans ce processus notamment (voies des : ABCA1, ABCG1, SR-B1 et LXR). Une activité enzymatique portant sur les transaminases (ALAT et ASAT) a également été réalisée dans le but d'évaluer l'effet protecteur du grenadier sur la fonction hépatique.

Dans une optique de faire le lien entre le potentiel antioxydant et antiathérogène du grenadier et la prévention contre le processus tumoral, un autre objectif a également été mis en évidence. Il s'agit de l'évaluation de l'effet antioxydant des extraits phénoliques de la grenade et de la Punicalagine sur des cellules humaines du cancer de la prostate (J82) en mesurant le taux des TBARS et des ROS.

TROISIÈME PARTIE :
MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Réactifs et produits chimiques

Tous les produits chimiques et biochimiques utilisés ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich chemical Co (Saint Louis, MO, USA), sauf l'acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique (Trolox), le $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'ascorbate de ferrozine, l' H_2O_2 , le ferricyanure de potassium, le tampon de phosphate, le chlorure ferrique, l'acide gallique, la catéchine, le réactif Folin-Ciocalteu, le nitrite de sodium, le chlorure d'aluminium, l'acide acétique glacial, l'acétonitrile et l'acide formique ont été obtenus de Sigma-Aldrich Chemical Co, (Pool, UK). L'éthanol, le méthanol, l'acide trichloroacétique (TCA), le carbonate de sodium et l'hydroxyde de sodium ont été achetés auprès de Fisher Scientific (Loughborough, UK). La colonne Phenomenex Synergi 4 μm Hydro-RP 80A (250 mm \times 4,6 mm \times 5 μm) et la colonne Phenomenex C18 5 μm (250 mm \times 3,0 mm) ont été obtenues auprès de Torrance, CA, USA.

2 Matériel végétal étudié

Le matériel végétal évalué dans notre étude est le fruit du grenadier (*Punica granatum L.*) de la variété « Sefri » d'Ouled Abdellah de la région de Béni Mellal-Khénifra (**Figure 17**). Les fruits ont été récoltés au hasard tout en évitant les fruits les plus exposés au soleil et aussi ceux moins ensoleillés. L'identification botanique a été confirmée par le botaniste Pr. Abbas Younes et un spécimen de référence a été déposé à notre herbier de laboratoire (Béni Mellal, Maroc). Les fruits ont été lavés et séchés à l'air libre, ensuite épluchés manuellement. Les arilles ont été pressés mécaniquement pour obtenir du jus de mélasse. Les écorces de grenade ont été séchées dans un endroit sec à l'ombre et à température ambiante. Après séchage, les écorces ont été broyées, la poudre obtenue a été conservée à -20°C dans des récipients hermétiquement fermés jusqu'à leur extraction.



Figure 17: Arbre, fleurs et fruits du grenadier « Sefri » d'Ouled Abdellah.

3 Critères pomologiques des fruits de grenadier

Le poids moyen (PM) de chaque fruit et de ses parties ont été déterminés, et les rendements en écorce (RE), en arilles (RA), en pépins (RP) et en jus (RJ) ont également été calculés en se basant sur les formules suivantes (Radunić et al., 2015):

$$\text{RA\%} = \frac{\text{Poids des arilles (g)}}{\text{Poids du fruit entier (g)}} \times 100$$

$$\text{RE\%} = \frac{\text{Poids des écorces (g)}}{\text{Poids du fruit entier (g)}} \times 100$$

$$\text{RP\%} = \frac{\text{Poids des pépins (g)}}{\text{Poids du fruit entier (g)}} \times 100$$

$$\text{RJ \%} = \frac{\text{Volume du jus (ml)}}{50 \text{ g des graines}} \times 100$$

4 Préparation des échantillons pour analyse

La poudre de la pelure et le jus de la grenade ont été soumis à une macération dans une solution de (70% méthanol/0.1% acide acétique) pendant 48 h à l'obscurité. L'extrait hydro-alcoolique a été centrifugé pendant 10 min et filtré sous vide à travers un papier filtre Whatman grade GF 10. Le surnageant est ensuite concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (T<40°C) suivi d'une lyophilisation. Les lyophilisats sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation (Barbero et al., 2008; Ma et al., 2009) (**Figure 18**).



Figure 18: Les étapes de la préparation des échantillons du grenadier.

5 Caractérisation chimique des extraits

5.1 Criblage phytochimique

La caractérisation des principaux éléments actifs des extraits de grenadier a été réalisée en se basant sur des réactions d'identification des différents groupes chimiques de métabolites secondaires (tanins condensés et hydrolysables, alcaloïdes, flavonoïdes, phytostérols, stéroïdes et tritérpénoïdes, carbohydrates, glycosides, acides aminés, protéines, coumarines, saponines, et finalement les lipides et les huiles fixes) selon des techniques décrites par plusieurs auteurs (Harborne, 1998; Roopalatha & Nair, 2013).

L'interprétation des résultats des tests phytochimiques effectués sur les différents extraits du grenadier s'est faite selon les qualificatifs suivant en se basant sur l'intensité de la coloration du milieu réactionnel :

Présence notable +++, **Présence modérée ++**, **Traces +**, **Absence -**

Après préparation des extraits du *Punica granatum* suite à un mélange de 3 g de poudre et de jus de l'échantillon avec 50 ml d'eau distillée bouillante pendant 60 minutes, les suspensions sont filtrées et les filtrats ont été utilisés pour des fins de caractérisation phytochimique.

5.1.1 Réaction de caractérisation des tanins

a. Test du chlorure ferrique

Afin de détecter la présence ou non des tanins dans les extraits du grenadier, on a ajouté quelques gouttes d'une solution aqueuse de trichlorure de fer (FeCl_3 à 2%) à chaque échantillon. La réaction donne une coloration brun-noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables) par contre si la couleur vire au bleu-verdâtre il y a présence des tanins catéchiques (tanins condensés). L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre dans le milieu réactionnel indique la présence d'un mélange de tanins condensés et hydrolysables (Qnais et al., 2007).

b. Test de gélatine salée

Cinq gouttes de gélatine à 1% contenant 10% de chlorure de sodium ont été ajoutés à 1 ml de l'échantillon afin de déterminer la présence des tanins condensés dans le milieu réactionnel. La formation d'un précipité blanc confirme le test ce qui indique la présence de tanins condensés de type pyrogallique (Roopalatha & Nair, 2013).

5.1.2 Réaction de caractérisation des alcaloïdes

a. Test de Dragendorff

La présence des alcaloïdes dans les extraits des fruits de grenadier a été déterminée par le réactif de Dragendorff. Dans un tube à essai, 5 ml d'une solution de 1% d'acide chlorhydrique est ajouté à 1 ml d'extrait et à quatre à cinq gouttes de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité rouge-brique ou d'une floculation dans l'extrait après addition du réactif indique la présence des alcaloïdes dans le mélange réactionnel (Qnais et al., 2007; Roopalatha &Nair, 2013).

5.1.3 Réaction de caractérisation des flavonoïdes

a. Test du chlorure de fer

L'identification des flavonoïdes dans les extraits des fruits de grenadier a été selon la méthode de chlorure ferrique (Bhandary et al., 2012). Le test consiste à rajouter quelques gouttes d'une solution de chlorure de fer (10%) à 1 ml de l'échantillon. Après 5 minutes d'incubation, l'apparition d'une coloration rouge-noirâtre indique la présence des flavonoïdes dans les extraits.

5.1.4 Réaction de caractérisation des phytostérols

a. Test de Libermann-Burchard

La méthode Libermann-Burchard a été utilisée pour déterminer la présence des phytostérols dans l'échantillon comme décrit par Roopalatha et Nair (Roopalatha &Nair, 2013) avec quelques modifications. Dans un tube à essai, 1 ml de la solution de chaque extrait du grenadier est ajouté à un 1 ml de solution d'anhydride acétique. Après agitation, le mélange est chauffé jusqu'à ébullition. Après refroidissement, 1 ml d'acide sulfurique concentré a été ajouté le long de la paroi du tube à essai incliné. Après une heure d'incubation, la formation d'un anneau brun- rouge à la jonction, et la transformation de la couche supérieur (phase aqueuse) en vert foncé confirment la présence des phytostérols dans l'échantillon à tester.

5.1.5 Caractérisation des tritérpénoïdes et des stéroïdes

a. Test de Salkowski

La mise en évidence de ces noyaux terpéniques met à profil la réaction de Salkowski. 2 ml d'extrait, 1 ml de chloroforme et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés le long du côté du tube à essai. L'apparition d'une coloration brune-rougeâtre formée à l'interface indique la présence des tritérpénoïdes dans le milieu réactionnel (Roopalatha &Nair, 2013).

b. Test de Libermann

L'identification des stéroïdes et des tritérpénoïdes dans les extraits du grenadier a été réalisée selon la réaction de Libermann. À 5 ml de chacun d'extraits sont ajoutés 2 ml de chloroforme, 1 ml d'anhydride acétique et 1 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'un anneau rose à rouge indique la présence des tritérpénoïdes, alors qu'une coloration bleu verdâtre confirme la présence des stéroïdes (Koffi et al., 2009; Victor & Obi, 2009).

5.1.6 Caractérisation des carbohydrates**a. Test de Fehling**

Dans un tube à essai, 2 ml d'extrait est ajouté à 1 ml d'eau distillée et 1 ml du réactif de Fehlin. Après agitation, le mélange réactionnel est chauffé à 60°C pendant 10 min dans un bain-marie. L'apparition d'un précipité rouge-brique confirme le test et indique la présence d'aldéhydes (Roopalatha &Nair, 2013).

b. Test de Molish

À 1 ml d'échantillon sont ajoutés quelques gouttes d'alpha-naphtol (1%) et 3 ml d'acide sulfurique concentré le long du côté du tube à essai. L'anneau violet rougeâtre ou pourpre formé à la jonction des deux liquides confirme le test (Roopalatha &Nair, 2013).

5.1.7 Caractérisation des glycosides cardiotoniques**a. Test de Keller –Killiani**

La présence des glycosides cardiotoniques est révélée suite à l'addition de 0,4 ml d'acide acétique glacial et quelques gouttes de solution de chlorure ferrique (5%) à 10 µl d'extrait de grenadier. Ensuite 0,5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés au mélange réactionnel, tout au long du tube à essai avec soin. L'apparition d'un anneau brun à l'interphase indique la présence des désoxy-sucres. Alors que, l'apparition d'une couleur bleu dans la couche d'acide acétique confirme le test (Bhandary et al., 2012; Roopalatha &Nair, 2013).

5.1.8 Caractérisation des glycosides d'antraquinones**a. Test d'hydroxyanthraquinone**

L'addition de quelques gouttes de solution d'hydroxyde de potassium (10%) à 1 ml de chaque extrait, permet de détecter la présence ou non des glycosides d'antraquinones. La formation d'une coloration rouge dans le milieu réactionnel confirme le test (Roopalatha &Nair, 2013).

5.1.9 Réaction de caractérisation des acides aminés

a. Test à la ninhydrine

Dans un tube à essai, 1 ml d'une solution de ninhydrine (0.2%) est additionnée à 1 ml de solution d'extrait, le mélange réactionnel est ensuite mis à ébullition. L'apparition d'une coloration violette confirme le test et indique la présence des acides aminés dans l'échantillon (Bhandary et al., 2012).

5.1.10 Réaction de caractérisation des protéines

a. Test de Biuret

La mise en évidence des protéines dans la solution d'essai met à profil la réaction de Biuret. A 2 ml de la solution d'extrait, cinq gouttes d'une solution de sulfate de cuivre (1%) et 2 ml de NaOH à 10% sont ajoutés. Après agitation, l'apparition d'une coloration pourpre indique la présence des protéines (Roopalatha et Nair, 2013).

5.1.11 Réaction de caractérisation des coumarines

Pour révéler la présence ou non des coumarines dans l'échantillon, 1 ml de la solution d'extrait a été placé dans un tube à essai et recouvert d'un papier filtre humidifié avec du NaOH (1 N). Le tube a été placé dans un bain-marie pendant 10 min avant qu'il soit retiré et examiné sous la lumière UV. L'observation d'une fluorescence jaune sous UV confirme le test ce qui indique la présence des coumarines dans le milieu réactionnel (Kumar et al., 2013; Rajesh et al., 2014).

5.1.12 Réaction de caractérisation des quinones

Pour déterminer la présence ou non des quinones dans les extraits, 1 ml de la solution d'échantillon a été ajouté à 1 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'une coloration rouge dans le mélange réactionnel indique la présence des quinones (Rajesh et al., 2014).

5.1.13 Réaction de caractérisation des saponines

L'apparition d'une mousse stable et persistante dans le milieu réactionnel 15 min après agitation de 5 ml de la solution d'extrait indique la présence des saponines dans les extraits testés (Bhandary et al., 2012).

5.1.14 Réaction de caractérisation des lipides et huiles fixes

Pour révéler la présence des lipides et des huiles fixes dans l'échantillon, quelques gouttes d'une solution d'hydroxyde de sodium (10%) ont été mélangées avec 1 ml de la solution d'extrait et 1 ml d'une solution de sulfate de cuivre à 1%. La formation d'une coloration bleu clair dans le mélange réactionnel confirme le test (Roopalatha &Nair, 2013).

5.2 Analyse quantitative des extraits phénoliques

5.2.1 Détermination de la teneur totale en protéines

La teneur en protéines totaux est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Cette méthode a pour principe la formation de complexes entre le bleu de Coomassie G-250 et les radicaux basiques et aromatiques des acides aminés constitutifs des protéines en milieu acide. Pratiquement, 5 µl d'extrait protéique sont ajoutés à 200 µl de réactif de Bradford dilué au 1/5^e (Bio-Rad). Après 5 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 595 nm. La composition en protéines totaux a été calculée à partir d'une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA).

5.2.2 Dosage des polyphénols totaux

La teneur phénolique totale des extraits est déterminée en se basant sur la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et al (Singleton et al., 1999) en y apportant quelques modifications. Cette méthode a pour principe la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'échantillon. Brièvement, 100 µl de chaque extrait est mélangé avec 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1/10 et 400 µl du carbonate de sodium (Na₂CO₃ : 20%). Après 2 h d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-6300 PC Double Beam Spectrophotometer, Germany). La concentration en composés phénoliques est déterminée à partir d'une gamme étalon de l'acide gallique et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g D'extrait sec). La teneur des polyphénols totaux est déterminée selon la formule suivante :

$$T = C \times V/M$$

T : c'est le total des composés polyphénoliques (mg Equivalent Acide Gallique/g d'extrait sec)

C : la concentration des polyphénols totaux, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

V : le volume de l'extrait (ml)

M : poids de l'extrait sec (g).

5.2.3 Détermination des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes totaux a été effectuée par spectrophotométrie selon la méthode de Woisky et al (Woisky & Salatino, 1998) avec quelques modifications. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. La quercétine est utilisée pour

élaborer la courbe d'étalonnage. Ainsi, 50 µl d'extrait ont été ajoutés à 1500 µl du méthanol à 95% et 100 µl de chlorure d'aluminium à 2%. Après incubation à température ambiante pendant 1 h, l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 425 nm et est exprimée en mg d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec.

5.2.4 Dosage des flavonols totaux

La quantification des flavonols totaux a été réalisée par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) additionné d'une solution d'acétate de sodium décrite par Oyedemi et al. (Oyedemi et al., 2010). Le mélange réactionnel était composé de 2000 µl d'une solution d'AlCl₃ à 2%, et 3000 µl d'une solution d'acétate de sodium à une concentration de 50 mg/ml, et 2000 µl d'extrait phénolique de l'écorce et des arilles du grenadier. Les tubes à essais ont été incubés à une température de 20°C et à l'obscurité pendant 2h. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 440 nm par un spectrophotomètre UV-Vis (UV-6300 PC Double Beam Spectrophotometer). Une gamme étalon de quercétine (0-100 µg/ml) a été préparée dans les mêmes conditions afin de déterminer la teneur en flavonols totaux (**Annexe I**).

5.2.5 Composition en anthocyanes totaux

La concentration en anthocyanes totaux des différents échantillons est estimée en se basant sur la méthode spectrophotométrique des pH différentiels (Mónica Giusti & Wrolstad, 2001). Cette méthode permet une mesure rapide et précise des anthocyanes totaux. Elle est basée sur la détermination de l'absorbance des extraits dilués avec des solutions tampon : (chlorure de potassium 25 mM à pH 1,0 et acétate de sodium 400 mM à pH 4,5). Un volume de 50 µl de chaque extrait est ajouté séparément à 3.6 ml de chacun des deux tampons. L'absorbance (Abs) est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 1,0} - (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

La teneur en anthocyanes totaux, exprimée en mg de cyanidine-3-glucoside, est déterminée comme suit :

$$\text{Teneur en anthocyanes totaux} = (\text{Abs} * \text{PM} * \text{FD} * 1000/\epsilon)$$

Avec,

Abs : Absorbance,

PM : Poids moléculaire de cyanidine-3-glucoside (449.2 g/mol),

FD: Facteur de dilution,

ε: Coefficient d'extinction molaire de cyanidine-3-glucoside (26 900 L.cm⁻¹.mol⁻¹).

5.2.6 Dosage des tannins condensés

Le contenu en tannins condensés a été estimé par la méthode de vanilline décrite par Price et al (Price et al., 1978) avec quelques modifications. Cette méthode consiste en une dépolymérisation des tannins en milieu acide suivit d'une formation d'anthocyanidols de couleur rouge en présence de vanilline analysables à 550 nm. Un volume de 50 µl de chaque échantillon a été mixé avec 1500 µl d'une solution vanilline/méthanol (4%) et 750 µl de l'acide chlorhydrique (HCl). Après incubation à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc. Une gamme étalon de la catéchine a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent catéchine par gramme d'extrait sec (mg Eq. Cat/g ES).

5.2.7 Détermination des tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont dosés par la méthode de Willis et Allen (Willis & Allen, 1998). Une mixture de 1 ml de l'extrait et de 5 ml d'une solution aqueuse de KIO₃ (2.5%) est vortexée pendant 20 secondes. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc. Les résultats sont exprimés en mg d'acide tannique par gramme d'extrait sec (mg Eq. AT/g ES).

5.2.8 Teneur en pro-anthocyanidines

La détermination de la teneur en pro-anthocyanidines dans les différents extraits de grenadier a été réalisée en se basant sur la procédure rapportée par Li et al. et Wang et al. (Li et al., 2006; Wang, 2011). Une quantité de 0.05 g d'extraits lyophilisés sont dissous dans 5 ml d'eau distillée. Dans un tube à essai, 1 ml de la solution d'extrait est mélangé avec 3 ml d'une solution méthanolique de vanilline à 4% et 1.5 ml d'acide chlorhydrique (HCl). Après incubation du milieu réactionnel pendant 15 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 500 nm et une courbe d'étalonnage est établie par la catéchine (0 – 0.08 mg/ml) pour déterminer la concentration en pro-anthocyanidines dans chaque extrait. Les résultats sont exprimés en équivalents catéchine (EC, mg /g de masse sèche).

5.2.9 Identification et quantification des composés phénoliques de la grenade par HPLC-DAD

La chromatographie en phase liquide à haute performance, qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, reste une technique populaire et efficace dû à sa reproductibilité et ses diverses possibilités de couplage avec d'autres techniques chromatographiques et / ou des systèmes de détection.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec un système de détection de barrette diodes (SPD-M10A) (Shimadzu, Japon) muni d'un système d'injection automatique (SIL-HTc), d'un système de dégazage (DGU-14A), d'un four pour colonne (CTO-10AS) et couplé à un détecteur UV/Visible à diodes, a été utilisé pour l'identification des composés phénoliques. La séparation par HPLC en phase inverse a été effectuée à l'aide d'une colonne Inertsil®WP300-C18 (250x4.6 mm, 5µm) et une pré-colonne (Canadian Life Science, ON, Canada). Le chromatogramme a été contrôlé à 220 nm-400 nm et les spectres étant enregistrés en continu tout au long de l'élution.

La phase mobile est constituée d'un mélange binaire de solvant A (eau bi-distillée et l'acide acétique à 0.2 %, pH 3) et B (Acéto-nitrile). L'échantillon est dissout dans le méthanol puis filtré à travers un filtre millipore 0,2 mm et 10 µL d'échantillon ont été injectés à une température de 30°C. La séparation a été réalisée sous un débit de 1 ml /min avec un gradient de solvants programmé selon le **Tableau 2**.

Les composés phénoliques ont été identifiés à partir de leurs longueurs d'onde d'absorption et de leurs temps de rétention en comparant les pics trouvés à des étalons de composés standards (l'acide gallique, l'α et la β punicalagine, et l'acide ellagique). Le pic de chaque composé est intégré et la surface est ainsi enregistrée en tenant compte des témoins qui nous ont permis d'étalonner l'appareil HPLC. Les 4 composés phénoliques choisis pour la calibration sont analysés à leur longueur d'onde d'absorption maximale. Chaque gamme étalon comporte cinq concentrations différentes qui seront analysées en HPLC dans les mêmes conditions, afin d'obtenir une droite de calibration. L'acide gallique, l'α et la β punicalagine et l'acide ellagique ont été dissous dans le méthanol et ont été utilisés à des concentrations allant de (0 à 0,3 mg/ml), (0 à 1 mg/ml) et (0 à 0,1 mg/ml), respectivement.

Tableau 2: Composition de la phase mobile utilisée en HPLC

Temps (min)	A %	B %
0-5	0	5
5-10	5	13
10-13	13	18
13-20	18	18
20-23	18	25
23-35	25	25
35-40	25	30
40-41	40	85

41-50	85	90
50-54	90	100
54-60	100	5

5.2.10 Détermination de la composition minérale des extraits par ICP-AES

La composition en macroéléments (P, K, Ca, Mg, Na) et en micro-éléments (Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Co, Cd) des extraits phénoliques de la grenade a été déterminée à l'aide d'une spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES Optima 8300 DV). Brièvement, 0,5 g des extraits ont été digérés en utilisant 5 ml de l'acide nitrique (HNO₃) à 65% et 2 ml du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30% dans un tube à essai. Ensuite le mélange a été chauffé initialement à 120°C pendant 10 minutes, et à 180°C. La température a été maintenue pendant 20 minutes. La solution a été transférée dans des fioles volumétriques et le volume final est ajusté à 25 ml avec de l'eau ultra-pure (Vali Pasha et al., 2018).

6 Étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques du grenadier

6.1 Piégeage du radical libre DPPH•

Pour étudier l'activité antioxydante des extraits phénoliques de la grenade, nous avons opté pour le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), selon le protocole décrit par Zhang et al avec quelques modifications (Zhang et al., 2007). Dans ce test les antioxydants réduisant le DPPH sous sa forme radicalaire de couleur violette en un composé jaune, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine en acceptant un atome d'hydrogène (**Figure 19**). L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle au pouvoir anti-radicalaire des extraits testés.

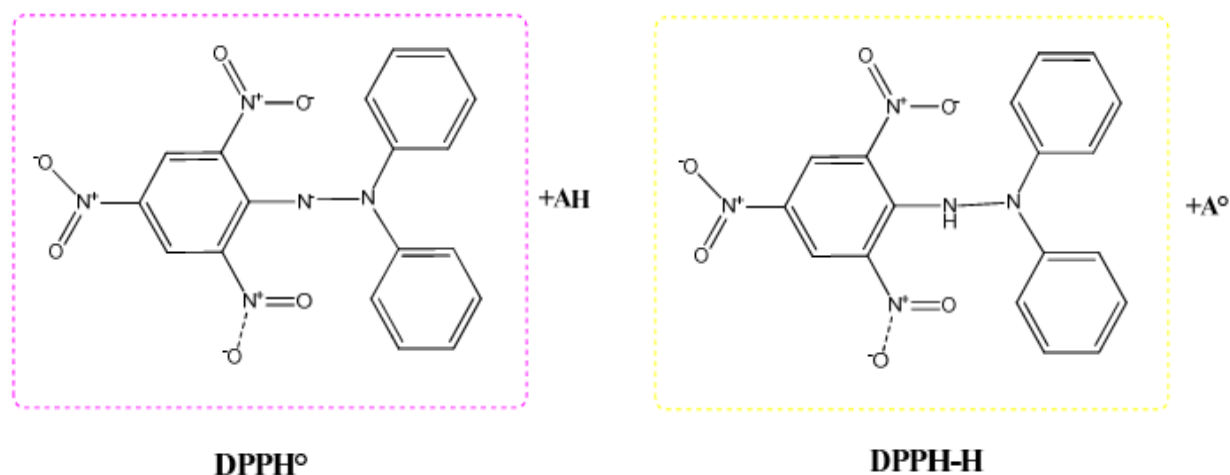


Figure 19: Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)

(Michel, 2011).

Brièvement, 50 µl des solutions d'extraits ont été mélangés avec 2000 µl d'une solution de DPPH (0.06 mM) préparée dans le méthanol. En parallèle, un contrôle négatif est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par du méthanol. L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 517 nm contre un blanc par un spectrophotomètre après incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. L'activité anti-radicalaire est déterminée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}) / Abs \text{ contrôle}] \times 100$$

6.2 Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est un dérivé non-radicalaire d'oxygène, il est considéré comme toxique pour les cellules car il provoque la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur des cellules. La capacité des extraits de la grenade à piéger l'H₂O₂ a été déterminée selon la méthode de Ruch et al. (Ruch et al., 1989). Cette méthode est basée sur l'absorption du peroxyde d'hydrogène dans le domaine de l'UV. La valeur d'absorbance de ce dernier diminue également à 230 nm en présence des composés piègeurs. Brièvement, une solution de H₂O₂ (40 mM) a été préparée dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7.4). L'absorption du mélange réactionnel contenant 500 µl de différentes concentrations des extraits ou de solution standard de l'acide ascorbique (0-200 µg/ml), ainsi que 1 ml de H₂O₂ a été mesurée après 30 min d'incubation contre un blanc à 230 nm. Le pourcentage de piégeage de H₂O₂ par l'extrait a été déterminé en utilisant la formule suivante (Gülçin, 2006) :

$$\% \text{ de piégeage de H}_2\text{O}_2 = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec A₀ : Absorbance de H₂O₂

A₁ : Absorbance de H₂O₂ en présence de l'échantillon

6.3 Évaluation de l'aptitude des extraits à piéger le radical ABTS⁺

La capacité des composés phénoliques de la grenade à inhiber le radical ABTS⁺ obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence (Trolox) a été évaluée selon la méthode de Re et al (Re et al., 1999). Le radical ABTS⁺ a été généré par l'oxydation de l'ABTS avec du persulfate de potassium (K₂S₂O₈) après incubation pendant 12 h à température ambiante et à l'obscurité. Avant le test, la solution mère de l'ABTS⁺ a été diluée avec du méthanol jusqu'à ce qu'elle atteigne une absorbance de 0.700 ± 0.020 à 734 nm. Ensuite, 1000 µl de la solution ABTS⁺ diluée ont été mélangés avec 10 µl de l'échantillon.

L'absorbance a été mesurée à 734 nm après 10 min d'incubation et la capacité de piéger le radical $ABTS^+$ a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de piégeage du radical } ABTS^+ = [(Abs_{ABTS} - Abs_E) / Abs_{ABTS}] \times 100$$

$Abs_{(ABTS)}$: Absorbance de la solution $ABTS^+$ et

$Abs_{(E)}$: Absorbance de l'échantillon. La concentration de l'extrait assurant une inhibition de 50% (IC_{50}) a été calculée à partir de la courbe représentant le pourcentage d'inhibition du radical en fonction de la concentration de l'extrait.

6.4 Méthode de la réduction du fer (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits testés est déterminé en se basant sur la méthode décrite par El Jemli et al (El Jemli et al., 2016). Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique en sel de fer de couleur bleu (**Figure 20**).

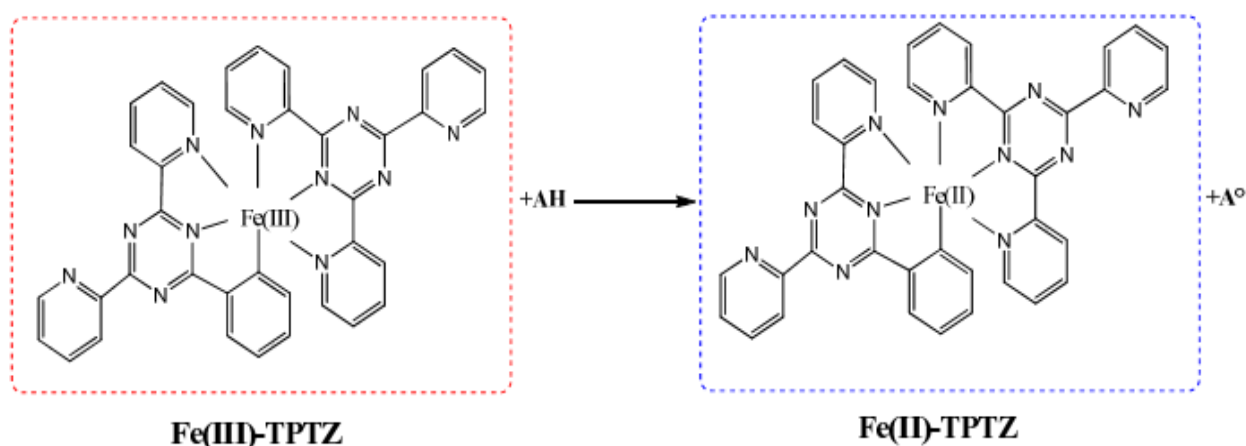


Figure 20: Mécanisme réactionnel intervenant entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH) (Michel, 2011).

Le protocole expérimental est résumé comme suit : 500 μ l des solutions d'extraits phénoliques de la grenade ont été mélangé avec 1 ml du tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 1 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après incubation, 1 ml de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10% a été ajouté pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (1,5 ml) de surnageant a été mélangé avec 1,5 ml d'eau distillée et 0,1 ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique ($FeCl_3$) à 0,1%. L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'échantillon par l'eau distillée. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle négatif. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation de la capacité réductrice des

échantillons étudiés. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait sec (mg AAE/ g ES).

6.5 Détermination de l'activité antioxydante totale (AAT)

La capacité antioxydante totale des échantillons de grenade a été évaluée par la méthode du phosphomolybdate telle que décrite par Prieto et al. avec des modifications minimales (Prieto et al., 1999). En bref, 200 µl d'échantillons d'écorces et d'arilles de grenade ont été mélangés avec 2 ml d'une solution contenant de l'acide sulfurique (0.6 M), du phosphate de sodium (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes à essai ont été incubés dans un bain d'eau bouillante à 95°C pendant 90 minutes. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 695 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible et les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait sec. Les tests ont été effectués en triplicata et les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± sem.

6.6 Test de blanchissement de bêta-carotène (BCB)

L'activité antioxydante des extraits riches en composés phénoliques des écorces et des arilles de grenade a été évaluée à l'aide du test de β-carotène-Acide linoléique selon la méthode de Jayaprakasha et al (Jayaprakasha & Jaganmohan, 2000). Dans un tube à essai, 0,2 mg de β-carotène, 0,5 ml de chloroforme, 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été mélangés. Après élimination du chloroforme sous vide, l'émulsion a été à nouveau diluée avec 40 ml d'eau distillée. Des aliquotes de 4 ml de cette solution ont été transférées dans une série de tubes contenant 0,2 ml de l'extrait. Dès que l'émulsion a été ajoutée dans chaque tube, l'absorbance au temps zéro (t=0 min) a été mesurée à 490 nm. La mesure de l'absorbance a été poursuivie jusqu'à la disparition de la couleur du bêta-carotène dans les tubes témoins (t=180 min) à un intervalle de temps de 15 min. Un mélange préparé comme ci-dessus sans l'ajout du bêta-carotène a servi de blanc. L'hydroxytoluènebutylé (BHT) a été considéré comme un contrôle négatif. L'activité antioxydante (AA) des extraits a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$AA = [1 - (A_0 - A_{180}) / (A^{\circ}_0 - A^{\circ}_{180})] * 100$$

A_0 et A°_0 sont les valeurs d'absorbance mesurées au temps zéro pour l'échantillon testé et le contrôle, respectivement, et A_{180} et A°_{180} sont les valeurs d'absorbance mesurées dans l'échantillon et le contrôle, respectivement, après incubation pendant 180 min. Toutes les mesures ont été effectuées en triplicata.

6.7 Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC)

L'activité antioxydante des extraits de grenade a été déterminée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en se basant sur la méthode au thiocyanate ferrique selon la procédure décrite par Zou et al (Zou et al., 2004). Tout d'abord, une émulsion d'acide linoléique a été préparée en mélangeant 0,5608 g d'acide linoléique, 0,5608 g d'émulsifiant Tween 20 et 100 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 7,0). Chaque solution d'extrait a été mélangée avec 5 ml d'émulsion d'acide linoléique et 5 ml du tampon de phosphate (0,2 M, pH 7,0). La réaction de peroxydation a été initiée par l'incubation du mélange réactionnel dans l'obscurité à une température de 40°C pendant 60 min. Le niveau de peroxydation a été mesuré en lisant l'absorbance à 500 nm selon la méthode au thiocyanate en mélangeant 10 ml d'éthanol (75%), 0,2 ml de thiocyanate d'ammonium (30%), et 0,2 ml de FeCl₂ (2 mM dans 3,5% HCl). D'autre part, un essai blanc a été préparé en mélangeant 5 ml d'émulsion d'acide linoléique et 5 ml de tampon de phosphate. L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une peroxydation plus élevée de l'acide linoléique. L'absorbance de la coloration rouge résultant de la solution, est lue pendant 10 jours à 500 nm au spectrophotomètre toutes les 24 heures jusqu'à ce que l'absorbance du contrôle négatif atteigne son maximum. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est alors calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - (\text{DO}_{\text{essai}} / \text{DO}_{\text{blanc}})) \times 100$$

6.8 Méthode de l'acide thiobarbiturique (TBA)

Les extraits (2 ml) et la solution standard (2 ml) du dernier jour (jour 8) du test FTC ont été ajoutés à 1 ml d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 20% et à 2 ml d'acide thiobarbiturique à 0,67%. Après une ébullition de 10 minutes, les échantillons ont été refroidis. Les tubes ont été centrifugés à 3.000 rpm pendant 30 minutes. L'absorbance du surnageant a été évaluée à 532 nm dans un spectrophotomètre (Saha et al., 2004). L'activité antioxydante a été calculée par le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique dans cette méthode comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 1 - [(A_1 - A_0) \times 100]$$

Avec A₀ est l'absorbance du contrôle et A₁ est l'absorbance des extraits de l'échantillon (Elmastaş et al., 2006).

6.9 Détermination de l'oxydation du plasma riche en lipoprotéines

Les extraits phénoliques du grenadier ont été évalués pour leur activité inhibitrice de la peroxydation lipidique selon la méthode de substances réactives avec l'acide thiobarbuturique (Thiobarbituric Acid Reactive Substances ou TBARS). Les acides gras sont très sensibles au stress oxydatif et notamment à la peroxydation lipidique. C'est en présence des substances oxydantes, que les lipides présents dans un substrat (plasma, jaune d'œuf, etc.) vont se transformer en malonaldéhyde (MDA), un des produits terminaux qui se forme lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés. Le principe de la méthode est basé sur la réaction de deux molécules d'acide thiobarbuturique (TBA) avec une seule molécule de malonaldéhyde (MDA) pour donner un composé d'une coloration rouge qui absorbe à une longueur d'onde de 532 à 535 nm (**Figure 21**). La détermination de l'absorbance de ce composé (TBRAS ou substances réagissant avec l'acide thiobarbuturique) permet donc de donner une idée sur l'importance de la dégradation des lipides sous l'action des radicaux libres (Nadal., 2010).

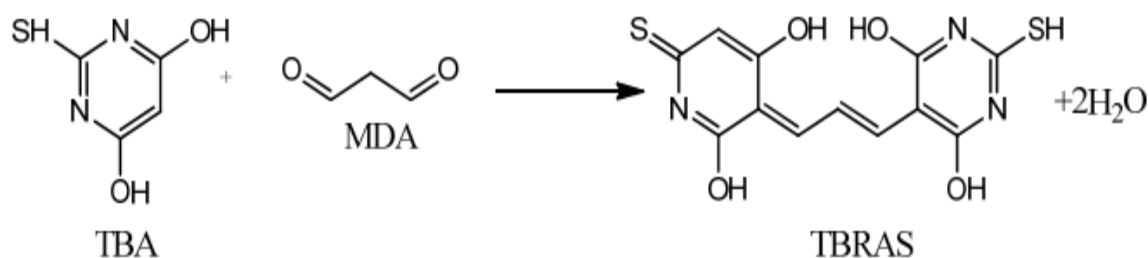


Figure 21: Principe de formation des produits de la peroxydation lipidique (TBARS) (Barrera et al., 2018; Gianazza et al., 2019).

La capacité des échantillons à inhiber la formation de malondialdéhyde (MDA) et, par conséquent, la peroxydation lipidique, a été mesurée en utilisant le test des TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) selon la procédure décrite par Park et al. avec quelques modifications (Park et al., 2002). Le plasma lipidique obtenu à partir des rats injectés avec du Triton WR-1339 à une dose de 600 mg/kg de poids corporel, a été utilisé comme substrat pour le processus oxydatif. 40 µl de plasma ont été ajoutés à un mélange réactionnel contenant 10 µl de sulfate de cuivre (CuSO₄, 5 H₂O, 0,33 mg/ml) et d'extraits (composés phénoliques) de grenade à différentes concentrations afin d'évaluer leur activité antioxydante à 30°C pendant 24 h. Pour chaque essai, nous avons ajouté 100µl de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 8.1%, le mélange a été agité et incubé pendant 60 min à température ambiante ; suivi de 60 min de chauffage à 95°C après l'addition de 250 µl de TCA (20%) et de TBA (0.8%). Après refroidissement, 1 ml de *n*-butanol a été ajouté et le

mélange a été vortexé. La solution a été centrifugée à 4500 r/min pendant 15 min et l'absorbance a été mesurée à 532 nm. Les TBARS ont été exprimés en nmole de malondialdéhyde (MDA)/mg en utilisant le 1, 1, 3,3- tétraéthoxy propane comme standard. Le 3,5-di-tert-4 butylhydroxytoluène (BHT) a été utilisé comme contrôle positif. Tous les tests ont été effectués en triplicata.

7 Effet des extraits phénoliques sur l'oxydation des LDL

7.1 Isolation des lipoprotéines de faible densité (LDL)

Les LDL (lipoprotéines de basse densité) ont été isolées à partir de plasma humain à jeun selon la méthode décrite par Sattler et al. (Sattler et al., 1994). Brièvement, les LDL ont été isolées par ultracentrifugation (543200g) à 15°C en utilisant une ultracentrifugeuse Beckman Optima TLX équipée d'un rotor TLA-100.4. Les lipoprotéines isolées ont été dialysées pendant la nuit à 4°C dans un tampon de phosphate de sodium (10^{-2} M ; pH 7,0). Les concentrations en protéines ont été mesurées à l'aide de kits commerciaux (Bio-Rad, Canada) selon le protocole du fabricant et ont été exprimées en concentrations de protéines totales.

7.2 Oxydation des LDL par le cuivre

Les LDL ont été oxydées en utilisant des ions de métaux de transition comme agents oxydants (Berrougui et al., 2009). 100 µg/ml de LDL ont été mis en suspension dans 10 mM de tampon phosphate de sodium (pH 7) et incubés en présence ou non des composés phénoliques du grenadier (écorces et arilles) à 200 µg/ml pendant 4 h et à une température de 37 °C en présence de 10 µM de sulfate du cuivre. Les réactions d'oxydation ont été arrêtées par refroidissement dans un bain de glace après addition d'EDTA (300 µM) et les peroxydes lipidiques formant ont été mesurés immédiatement.

8 Marqueurs biochimiques de la peroxydation lipidique

8.1 Formation des diènes conjugués

L'oxydation des LDL en présence ou non d'extraits phénoliques de grenade a été surveillée en continu à 234 nm pour détecter la formation des diènes conjugués (DC) selon la procédure décrite par Berrougui et al. (Berrougui et al., 2006).

8.2 Mesure de l' α -tocophérol endogène au niveau des LDL

La teneur en vitamine E (α -tocophérol) endogène dans les LDL a été dosée après 2 heures d'oxydation des LDL en présence ou non des composés phénoliques des écorces et des arilles du grenadier (200 µg/ml) par HPLC en phase inverse avec détection électrochimique (cellule électrochimique ESA Coulochem II 50-10A) et UV (contrôlée à 292 nm) comme décrit par Berrougui et al. (Berrougui et al., 2006). Une colonne Sephasil-peptide (C18 5 µm

ST 4.6/250) (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) a été utilisée. L'acétate de tocophérol a été utilisé comme standard interne. La phase mobile a été constituée de méthanol-éthanol-isopropanol (88:24:10 ; v/v/v) contenant du perchlorate de lithium (20 μM) à un débit de 1 ml/min.

9 Mesure de l'activité et l'expression de la paraoxonase 1

Les cellules hépatiques Fu5AH ont été fixées, perméabilisées à l'aide du kit (abcam) et marquées avec l'anticorps anti-PON1 (ab24261, $1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ cellules) pendant 30 min à RT. L'anticorps secondaire utilisé était l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris DyLight® 488 (ab96879) à une dilution de 1/500 et l'incubation était pendant 30 min à RT. Les données ont été recueillies à l'aide d'un cytomètre en flux CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, Californie, États-Unis). L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo 10.2 (Tree Star Inc., Ashland, OR, États-Unis).

L'activité de la paraoxonase PON 1 a été mesurée dans les échantillons de plasma traités ou non par les extraits riches en composés phénoliques du grenadier (0 à 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 2 h, en utilisant le paraoxon comme substrat selon la procédure décrite par Jaouad et al. (Jaouad et al., 2006). En bref, l'activité a été mesurée en mélangeant 50 μl d'échantillon avec 1 ml du tampon Tris/HCl (pH 8.0) à 100 mM, CaCl_2 à 2 mM et le paraxon à 5,5 mM. Le taux de libération de 4-nitrophénol a été mesuré à 412 nm et l'activité enzymatique a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de l'ordre de ($17\ 100. \text{M}^{-1}. \text{cm}^{-1}$). Une unité d'activité paraoxonase a été définie comme étant le 1 nM de 4-nitrophénol formé par minute.

10 Culture cellulaire et conditions de traitement pour l'activité antioxydante

10.1 Lignée cellulaire

Durant ce travail, la lignée cellulaire utilisée est la lignée J82 humaine, c'est une lignée cellulaire prélevée dans un carcinome de la vessie, elle provient de «American Type Culture Collection (Manassas, VA) ». Ce sont des cellules adhérentes qui, une fois en culture dans des conditions adéquates, se développent et forment un tapis sur le fond des fioles. La lignée cellulaire est cultivée dans un milieu de culture composé de Dulbecco Eagle additionné de 10 % de SVF (Sérum de Veau Fœtal). Les cultures ont été incubées dans un incubateur sous une atmosphère humide (95%) à 37°C et à 5% de CO_2 . Les cellules ont été trypsinisées avec un milieu contenant 0,05% d'EDTA et 0.02 % de trypsine.

10.2 Détermination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules J82

Les cellules du cancer de la vessie J82 ont été mises en culture à raison de ($2,5 \times 10^4$ cellules/puits) dans des plaques de 24 puits. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé

par un nouveau milieu contenant les extraits riches en composés phénoliques du grenadier (0,1 et 0,2 mg/ml), puis les cellules ont été incubées pendant 2 heures. Après lavage des cellules avec du PBS, 10 $\mu\text{mol/L}$ de la dichlorofluorescein-diacétate (DCFH-DA) ont été ajoutés à chaque puits et ensuite incubées pendant 45 min à une température de 37°C. Les cellules sont lavées à nouveau avec du PBS pour éliminer l'excès du DCFH-DA. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2h en présence de 100 μM de TBHP (hydroperoxyde de tert-butyle). La fluorescence a été immédiatement enregistrée à l'aide d'un lecteur de plaques (Victor multilabel plate reader ; PerkinElmer, Canada) et l'intensité de la fluorescence a été quantifiée avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 492 et 517 nm, respectivement (Yang et al., 2020).

10.3 Détermination des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans les cellules J82

Pour la détermination des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS), les cellules J82 ont été incubées en présence ou non des extraits riches en composés phénoliques de l'écorce et des arilles du grenadier (100 ou 200 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24h, puis avec 100 μM de TBHP (hydroperoxyde de tert-butyle) pendant 3h. Les surnageant des cellules ont été recueillis et centrifugés (13000g pendant 1min à 4°C) puis la suspension a été mélangée avec 200 μl de TCA (30 %) et 200 μl de Tris-HCl (200 mM, pH 7,4) et incubées pendant 10 min à température ambiante (Botsoglou et al., 1994; Venkatesan et al., 2019). Ensuite, les surnageant ont été incubés à (95°C pendant 1 h) en présence d'une solution de Na_2SO_4 (2M) et de TBA à (55 mM) et ensuite refroidis pendant 5 min à 4°C. Après l'ajout du TCA (70%), les surnageant sont centrifugés (13000g pendant 1 min à 4°C), et l'absorbance a été mesurée à 532 nm. Les protéines cellulaires totales ont été évaluées à l'aide du test BCA (acide bicinchonique). La concentration des TBARS dans les échantillons est alors calculée par extrapolation à partir la courbe de calibration MDA (Malondialdéhyde). Chaque expérience a été réalisée au moins en triplicata.

11 Effet des extraits phénoliques de grenade sur l'efflux de cholestérol

11.1 Mesure de l'efflux de cholestérol *in vitro*

L'effet des extraits riches en composés phénoliques de grenade sur l'efflux de cholestérol médié par le transporteur ABCA1 a été évalué en utilisant des macrophages J774. Des macrophages J774 chargés en cholestérol radio-marqué (^3H) ont été incubés pendant 12 h avec l'extrait des arilles (0 à 4 mg/ml) ou avec les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles (0 à 200 $\mu\text{g/ml}$) pour générer des cellules enrichies en ABCA1 ou avec 300 μM de 8-

bromo-AMPC (contrôle positif) pour stimuler la transcription du gène ABCA1 et l'expression de la protéine de surface. Les macrophages J774 ont ensuite été incubés avec 25 µg/ml d'apo-A1 pendant 4 h. Pour mieux comprendre le mécanisme de l'efflux de cholestérol médié par les extraits riches en polyphénols de grenade, nous avons étudié l'effet du principal composé phénolique de la grenade, la punicalagin sur l'efflux de cholestérol médié par le transporteur ABCA1. Des macrophages J774 chargés en cholestérol ³H ont été incubés pendant 12 h avec 0 à 20µM de punicalagin pour générer des cellules enrichies en ABCA1, et ont été ensuite incubés avec 25 µg/ml d'apo-AI pendant 4 h.

L'efflux de cholestérol a été déterminé par comptage à l'aide d'un compteur à scintillation liquide, et le pourcentage de cholestérol radio-marqué libéré (pourcentage d'efflux de cholestérol) a été calculé à l'aide de la formule suivante : [radioactivité du milieu / (radioactivité du milieu + radioactivité du lysat cellulaire)] x 100. La quantité de radioactivité est exprimée en coup par minute (cpm).

11.2 Analyse par le western blot

L'expression des protéines ABCA1, ABCG1 et SR-B1 dans les macrophages J774 a été évaluée en les incubant avec une concentration de 0 à 4 mg/ml de l'extrait des arilles ou avec une concentration de 0 à 0.2 mg/ml des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles, ou 20 µM de punicalagine pendant 12 h. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 10% et ont été transférées sur des membranes en difluorure de polyvinylidène (PVDF). Les membranes ont été bloquées à l'aide d'un tampon de blocage (5% de lait écrémé dans du PBS/Tween 20) et ont été incubées avec des anticorps primaires (anti-ABCA1) puis avec des anticorps secondaires spécifiques conjugués IgG couplés Horse Radish Peroxidase HRP. La Bêta-Actine a été utilisée comme témoin. Les bandes de protéines ont été détectées à l'aide d'un réactif de détection de type électro-chimiluminescence (ECL).

12 Étude *in vivo*

12.1 Animaux étudiés et conditions d'élevage

Les animaux utilisés dans notre étude étaient des rats albinos de souche *Wistar* de sexe mâle âgés de 4 mois avec un poids moyen entre 150 et 200 g pour l'étude de la toxicité aiguë et de l'effet antiathérogène et hypolipémiant. Les animaux ont obtenus auprès de l'animalerie de la Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Maroc et sont hébergés dans des cages en acier inoxydable. Ils sont acclimatés dans une pièce (ventilée avec une humidité relative de 50%, une température ambiante (20 - 25°C) et un cycle lumière/obscurité (12h/12h).

La nourriture et l'eau sont données *ad libitum*. Les rats sont nourris avec un régime alimentaire standard des rongeurs (ALF SAHEL-Casablanca, Maroc). Pour la composition voir **annexe II**.

12.2 Étude de la toxicité aiguë

12.2.1 Test de la dose limite

Des essais de toxicité ont été réalisés afin d'éviter tout éventuel risque lors des analyses biologiques. Le test de toxicité aiguë des extraits a été réalisé selon la méthode décrite par l'Organisation de la Coopération Économique et Développement OECD, Essai n°423 (OECD/OCDE, 2001). Ce test est réalisé sur un effectif de 15 rats mâles pesant environ 150 ± 5 g, répartis en trois lots de 5 rats et maintenus à jeun avant le début de chaque expérimentation. Les groupes ont été répartis comme suit :

- **Lot 1** : Reçoit par voie orale une solution de NaCl (0.9%).
- **Lot 2** : L'extrait phénolique de l'écorce à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0.9%.
- **Lot 3** : L'extrait phénolique des arilles à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0.9%.

Un volume de 1 ml de chaque extrait a été administré aux rats par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique. Les rats sont privés de nourriture mais pas d'eau, pendant 2 heures après l'administration. Elles sont observées individuellement durant les 15 premières minutes suivant l'administration et régulièrement durant les 24 heures qui suivent, puis quotidiennement par la suite. La période d'observation totalisant 14 jours, pour toute manifestation anormale, hyperactivité, convulsion et mortalité (Dutok et al., 2015).

12.2.2 Test de toxicité aiguë des extraits à différentes concentrations/doses (Détermination de la DL50)

La toxicité aiguë correspond aux effets secondaires d'une substance qui se manifeste rapidement, voir immédiatement après administration par voie orale ou cutanée d'une dose unique ou à court terme après plusieurs doses rapprochées. La dose létale 50 médiane (DL50) est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. C'est la dose d'une substance chimique qui, une fois administrée aux rats, provoque la mort de 50 % d'entre eux, plus la DL50 est faible, plus la substance est toxique. L'analyse par la méthode de probits (méthode des moindres carrés, Méthode de Finney), en utilisant le logiciel SPSS21 (IBM SPSS Statistics 21. USA) (Abu Sitta et al., 2009), a été utilisée pour déterminer la DL50 des deux extraits brutes de l'écorce et des arilles du grenadier *in vivo*. Les rats préalablement mis à jeun

pendant une période de 24 h, sont répartis en 6 groupes de 5 rats. Les doses utilisées des deux extraits du grenadier sont : (0, 300, 500, 1000, 1500, 2000 mg/Kg). Les extraits ont été dissous dans du NaCl à 0.9 % et administrés aux rats par voie orale à raison de 1 ml de solution à l'aide d'une sonde gastrique. Le lot témoin ne recevait que du NaCl 0,9 %. Par la suite, les symptômes possibles sont observés ainsi que le nombre de morts au bout du temps imparti (les premières 15 min, ensuite les 1^{ère} h, 2^{ème} h, 24^{ème} h, 72^{ème} h jusqu'au 14^{ème} jour).

12.3 Étude préliminaire de l'effet du grenadier sur l'hypercholestérolémie et la dyslipidémie

12.3.1 Induction de l'hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie a été induite chez des rats *Wistar* mâle par une injection intrapéritonéale (IP) de Triton WR 1339 (300 mg/Kg du poids corporel). Après 24 heures, les rats ont présenté des niveaux élevés de cholestérol et de triglycérides dans le plasma (Vijayaraj et al., 2013).

12.3.1.1 Plan expérimental

Cinq groupes, comprenant chacun 6 rats. Après induction de l'hyperlipidémie (24 h), les extraits phénoliques du grenadier (écorce et arilles) ou la simvastatine ont été administrés aux rats hyperlipidémiques par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique (**Tableau 3**). Les lots traités avec les extraits phénoliques de *Punica granatum* ont été répartis comme suit :

- Lot témoin (n=6) : reçoit par voie orale une solution de NaCl (0.9%).
- Lot hypercholestérolémique (n=6) : reçoit par voie IP du Triton WR 1339 (300 mg/Kg de poids corporel dissous dans du NaCl à 0.9%).
- Lot standard (n=6) : reçoit par voie orale un médicament hypolipémiant (simvastatine à raison de 10 mg/Kg de poids corporel dissous dans du NaCl à 0.9%).
- Lot EPE : reçoit de l'extrait phénolique de l'écorce de *P. granatum* à une dose de 250 mg/kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0.9%
- Lot EPA : reçoit de l'extrait phénolique des arilles de *P. granatum* à une dose de 500 mg/kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0.9%

Tableau 3: Répartition et doses injectées pour chaque groupe

Groupe	Solution injectée	Dose (mg/Kg de poids corporel)
Témoins -	NaCl (0.9%)	/
Témoin +	Triton 1339	300
Simvastatine	Simvastatine	10
EPE	EPE	250
EPA	EPA	500

Le prélèvement sanguin a été réalisé chez des rats anesthésiés par l'éther diéthylique et les échantillons de sang ont été prélevés dans des tubes héparinés, centrifugés à (1500 g / 5 min / 4°C). Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à (-20°C) jusqu'à son utilisation pour le dosage du profil lipidique (Cholestérol total, Triglycérides, HDL-c et LDL-c) et la détermination du statut oxydatif.

12.3.2 Effet antiathérogène des extraits phénoliques du grenadier

12.3.2.1 Plan expérimental

48 rats *Wistar* mâles adultes pesant environ 150-190 g ont été répartis en 6 groupes de 8 animaux et ont accès *ad libitum* à l'eau fraîche et à un régime alimentaire spécifique selon la nature du groupe. Le groupe contrôle reçoit un régime standard (composé de maïs, de soja, de vitamines), alors que les autres groupes (G2-G6) reçoivent un régime hypercalorique et hypocholestérolémiant RHCC composé de (57% de régime standard, 20% de graisse animale, 3% de cholestérol, 15% de fructose et 5% d'huile de maïs) pendant 3 mois.

Les groupes expérimentaux ont été répartis comme suit :

- Groupe témoin (GT) : les rats ont reçu une alimentation standard et de l'eau distillée par gavage.
- Groupe RHCC : reçoit une alimentation riche en graisses et de l'eau distillée par voie orale.
- Groupe RHCC+Simvastatine (RHCC+S) : reçoit une alimentation riche en matières grasses et un traitement à la simvastatine (10 mg/kg de poids corporel/jour) par voie orale.
- Groupe RHCC+EPE: reçoit une alimentation riche en matières grasses et l'extrait phénolique de l'écorce de grenade (250 mg/Kg de poids corporel/jour) par gavage.

- Groupe RHCC+EPA: reçoit une alimentation riche en matières grasses et l'extrait phénolique des arilles de grenade (250 mg/Kg de poids corporel/jour) par gavage.
- Groupe RHCC+RHCC+FE : reçoit une alimentation riche en matières grasses et l'extrait phénolique du fruit entier de grenade (250 mg/Kg de poids corporel/ jour) par voie orale.

À la fin de la période de traitement (3 mois), les rats sont sacrifiés et le sang a été prélevé et le plasma a été utilisé pour établir le profil lipidique et évaluer le stress oxydatif.

12.4 Suivi des animaux

12.4.1 Observation générale de l'état des animaux

Après 3 mois du traitement avec les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles du grenadier et avec un régime hypercalorique et riche en cholestérol, l'état sanitaire général des animaux a été observé.

12.4.2 Mesures physiologiques

Le poids corporel est parmi les paramètres les plus importants dans toute étude expérimentale car c'est un indicateur de la santé physique. Le poids de chaque rat est mesuré chaque semaine à l'aide d'une balance électronique, et ce durant toute l'étude.

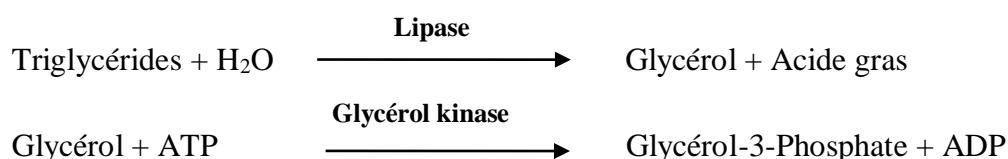
12.5 Procédure histologique

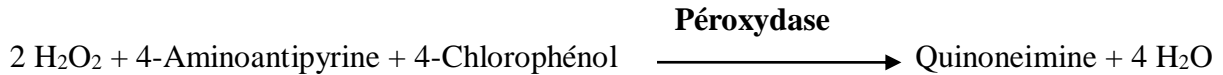
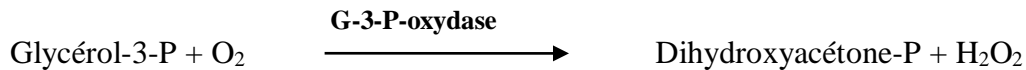
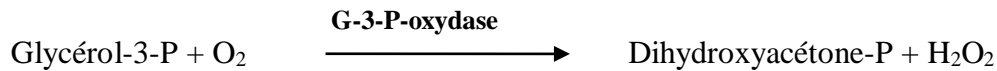
Après 3 mois du traitement, les rats ont été euthanasiés et les organes (foie et aorte) ont été récupérés, pesés et conservés dans du formaldéhyde à 10 % pour l'étude histologique. Les foies sont pesés et divisés en deux sections, une section pour l'examen histologique et une autre qui servira pour la détermination de l'acide thiobarbiturique (TBARS) et des lipides (cholestérol total et triglycérides).

12.6 Estimation des paramètres lipidiques dans le plasma

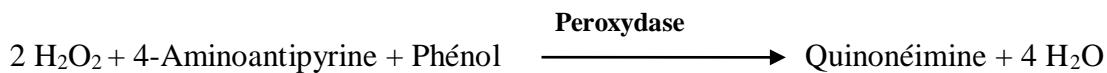
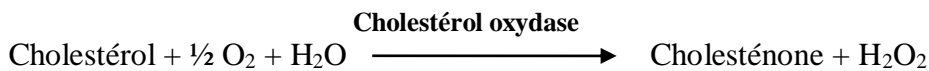
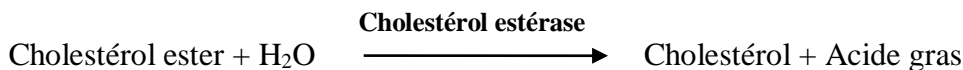
À partir du sérum collecté, nous avons dosé différents paramètres lipidiques comme : les triglycérides, le cholestérol total, le LDL/VLDL-c et le HDL-c. Le cholestérol total (CT), les triglycérides (TG), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL) dans le plasma ont été déterminés à l'aide de kits enzymatiques (Biosystems, Barcelone, Espagne).

Les triglycérides présents dans l'échantillon donnent un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie à 500 nm selon les réactions suivantes :

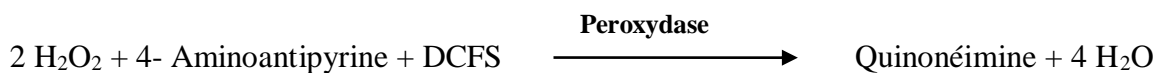
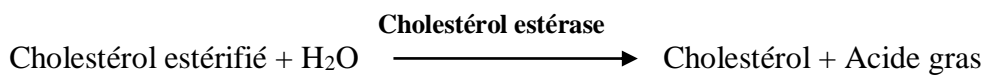




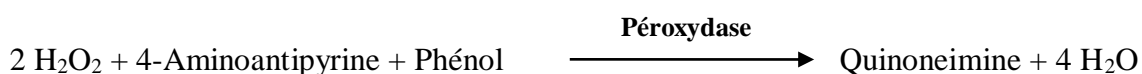
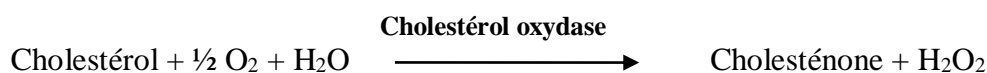
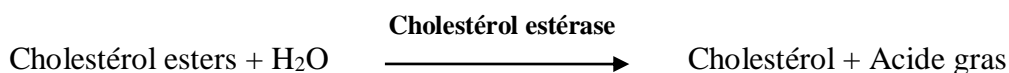
Le cholestérol libre ainsi que le cholestérol estérifié présents dans l'échantillon, donnent un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie selon les réactions couplées décrites ci-dessous :



Pour le dosage des LDL et HDL, une première étape de précipitation des LDL en présence de phosphotungstate et d'ions magnésium permet d'obtenir la fraction du sérum contenant les HDL. Le liquide surnageant de la centrifugation contient les HDL, dont le cholestérol est quantifié par spectrophotométrie selon les réactions suivantes :



Les LDL présentes dans l'échantillon, précipitent en présence de sulfate de polyvinyl. La concentration en cholestérol LDL est calculée en faisant la différence entre les valeurs en cholestérol dans le plasma et dans le surnageant obtenues après centrifugation. Le cholestérol est quantifiable par photométrie grâce aux réactions couplées suivantes :



Le couple enzymatique cholestérol/estérase et cholestérol/oxydase permet alors de libérer le cholestérol contenu dans la fraction et d'oxyder le cholestérol libre produisant un

chromogène identifiable à 500 nm. Ceci est réalisable sur la fraction contenant le HDL et la fraction contenant le LDL/VLDL.

12.7 Détermination de la glycémie à jeun

La mesure de la glycémie à jeun chez les groupes des rats normaux témoins et traités a été réalisée par intervalle régulier de 7 jours à l'aide d'un glucomètre à bandelettes.

12.8 Dosage des espèces réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)

La peroxydation lipidique a été indirectement estimée en déterminant l'accumulation de substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans le foie (Ohkawa et al., 1979). Les TBARS ont été exprimés en nmole de malondialdéhyde (MDA)/mg de protéine en utilisant le 1, 1, 3,3- tétraéthoxy propane comme standard. Les niveaux de protéines tissulaires ont été déterminés par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

12.9 Évaluation de la fonction hépatique

La fonction hépatique a été évaluée en mesurant les taux sériques d'alanine aminotransférase (ALAT) et d'aspartate aminotransférase (ASAT).

12.10 Paramètres morphologiques pour mesurer l'obésité

L'augmentation du poids corporel a été calculée comme la différence entre le poids corporel final et le poids corporel initial mesurés respectivement au jour 90 et au jour 0. L'indice de masse corporelle (IMC) a été calculé selon la formule suivante (Novelli et al., 2007):

$$\text{IMC} = \text{Poids corporel (g)} / \text{taille}^2 \text{ (cm}^2\text{)}$$

12.11 Paramètres et indices d'atherogénicité

Après avoir déterminé la concentration en mg/dL du cholestérol total (CT), des triglycérides totaux (TG), des lipoprotéines HDL-c et LDL-c, les indices athérogènes (AIP, CRR, AC et CPI) ont été calculés en utilisant les valeurs des paramètres du profil lipidique de la manière suivante (Muruganandan et al., 2005; Suanarunsawat et al., 2009):

$$\text{Indice athérogène du plasma (AIP)} : \text{AIP} = \log (\text{TG}/\text{HDL-c})$$

$$\text{Coefficient athérogène (CA)} : \text{CA} = (\text{CT} - \text{HDL-c})/\text{HDL-c}$$

$$\text{Rapport de risque cardiaque (CRR)} : \text{CRR} = (\text{TC}/\text{HDL-c})$$

$$\text{Indice de protection cardiaque (IPC)} : \text{IPC} = (\text{HDL-c}/\text{LDL-c})$$

$$\% \text{ de protection} = \text{CA du groupe RHCC} - \text{CA du groupe traité} / \text{CA du groupe RHCC} \times 100$$

12.12 Examen histologique

Les rats sont anesthésiés en utilisant le chloral (7%), et les organes sont prélevés puis fixés dans une solution de formol à 10% pour l'étude histologique.

12.12.1 Évaluation de la morphologie du foie et de l'aorte

12.12.1.1 Étude histologique

Cette étude est réalisée à la fin des expérimentations sur les tissus des organes des rats (foie et aorte). Le foie et l'aorte ont ensuite été isolés, nettoyés et séchés, puis fixés dans une solution tampon de formol neutre à 10 %. Pour les observations histo-pathologiques, des sections longitudinales du tissu myocardique ont été coupées au niveau des lésions macroscopiques. Quant au foie, les sections ont été coupées au niveau des lésions macroscopiques, y compris les capsules. Les sections ont été coupées à 4 µm d'épaisseur et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). L'étude histologique a été réalisée selon le protocole suivant :

a. Fixation

Les organes prélevés sont fixés avec du formol dilué à 10%.

b. Macroscopie

La réalisation de fragments pour chaque organe. Introduction de ces organes dans des cassettes d'inclusion, les cassettes ont été marquées sur leur bord au crayon.

c. Circulation

Introduction des cassettes dans un appareil de circulation ou de déshydratation durant 24 heures en passant par 12 bacs comme suit :

- Bac 1 : formol à 10 % durant une heure et demi-heure,
- Bac 2 : éthanol à 50% durant une heure,
- Bac 3 : éthanol à 60° durant une heure,
- Bac 4 : éthanol à 70° durant une heure,
- Bac 5 : éthanol à 80° durant une heure,
- Bac 6 : éthanol à 90° durant une heure,
- Bac 7 : éthanol à 96° durant une heure,
- Bac 8 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 9 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 10 : Xylène ou toluène durant une heure et demi-heure,
- Bac 11 : paraffine liquide durant deux heures,
- Bac 12 : paraffine liquide durant deux heures.

d. Inclusion et enrobage

Le raffinage a lieu grâce à un appareil muni d'un compartiment chauffé pour couler la paraffine (56°C – 58°C), et d'une plaque de refroidissante sur laquelle est mis un métallique

contenant les cassettes où les pièces sont mises. Une fois les pièces de paraffine liquide, elles sont laissées refroidir sur une plaque à froid. Ainsi, on obtient les blocs qui seront utilisés pour donner de fines coupes. Les blocs sont conservés au froid jusqu'à leur utilisation.

e. Coupe

Des coupes de 4 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM2245), le ruban fractionné est porté sur une lame en verre, la lame est mise sur une plaque chauffante pour permettre un bon étalement et éviter la formation des plis. Les lames sont marquées sur leur bord par un stylo à diamant. Ensuite elles sont mises dans un plateau et l'incubation est effectuée sous une température de (50°C- 56°C) pendant toute la nuit.

f. Coloration

La coloration est réalisée dans un appareil spécifique avec de l'Hématoxyline-Éosine pour les échantillons des rats. Après la coupe des blocs les lames sont séchées dans l'étuve à 65°C pendant 20 min. Les échantillons sont traités par plusieurs produits et dans plusieurs bacs comme suit :

- Déparaffinage : 2 bains de toluène 3 minutes chacun
- Hydratation : 5 bains d'alcool 3 minutes chacun
 - 2 bains d'alcool absolu
 - 1 bain d'alcool 95%
 - 1 bain d'alcool 80%
 - 1 bain d'alcool 70%
- 1 Bac de solution de lavage pendant 3 minutes pour faire laver les lames
- Coloration des noyaux : 1 bain d'hématéine pendant 15 minutes
- 1 Bac de solution de lavage 5 minutes
- 1 Bac d'alcool ammoniacal durant 15 secondes
- 1 Bac de solution de lavage durant 15 secondes
- 1 bain d'alcool-acide pendant 15 secondes
- 1 Bac de lavage avec de l'eau distillée
- Coloration du cytoplasme : 1 bain d'Éosine 3 minutes
- 2 bains d'alcool 96% durant 3 minutes
- 2 bains d'alcool absolu pendant 3 minutes
- Déshydratation dans l'étuve pendant 3 minutes
- Éclaircissement : 2 bains de toluène 2 minutes chacun

g. Montage

Une goutte d'une solution (EUKITT) est déposée permettant ainsi l'adhésion sur la lame en présence d'une lamelle propre et sèche en inclinant progressivement cette dernière de façon que la solution s'étende peu à peu et recouvre la coupe sans emprisonner les bulles d'air.

h. Lecture microscopique

La lecture est réalisée par un photo-microscopique (Leica DMD108) et chaque coupe est photographiée.

13 Données et analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne \pm sem. Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois indépendamment. Les valeurs moyennes ont été comparées à l'aide du test *t* de Student de comparaison de moyenne non apparié ou de l'ANOVA unidirectionnelle (test de comparaisons multiples des moyennes de Dunnett). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 8 (GraphPad Software®, Inc., La Jolla, CA, USA). Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque $p < 0.05$.

QUATRIÈME PARTIE :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : Caractérisation pomologique, phytochimique et biochimique de la grenade « Sefri »

1 Introduction

Dans le but de valoriser les variétés marocaines du grenadier qui possèdent des caractéristiques biochimiques importantes, notamment en termes de composition phénolique, minérale et aussi activité antioxydante, de nombreuses études ont été menées pour une meilleure sélection des variétés ayant des propriétés thérapeutiques intéressantes. Toutefois, pour une variété donnée et dans des conditions bien définies, la composition phénolique varie également au cours du développement et de la maturation du fruit, elle dépend de nombreux facteurs comme les conditions climatiques, les conditions de culture et l'état de maturité, et aussi de la fertilisation qui influencent de manière importante les caractéristiques du fruit (Hmid, 2013). Ces variations sont plus ou moins significatives, mais très rarement minimes d'une variété à une autre. Il existe un grand nombre de variétés de grenades qui ne se différencient pas seulement par leur morphologie, mais aussi par leur composition biochimique, en particulier par leur teneur en acide, sucre, vitamines, minéraux et en composés phénoliques. Les différentes variétés de grenadier sont souvent regroupées en grenades aigres, aigres-douces et douces selon leur composition en sucre et en acide (Hmid, 2013). Deux grands groupes de variété de grenadier sont cultivées au Maroc : les grenades à pépins doux, consommées en frais comme le Sefri, Zhéri, Kharazi, et Laroussi et les grenades acides à pépins durs, destinés à la transformation comme le Wonderful, le Negro, et le Monstruoso.

La production annuelle de grenades du Maroc dépasse 58.000 tonnes sur une superficie totale de 5.000 hectares (Hmid et al., 2013; Martínez et al., 2012) et la moitié de cette production est cultivée dans le centre du Maroc sur les plans du Moyen Atlas (zone de Béni Mellal-Khénifra) et est principalement représentée par la variété Sefri. Il existe de nombreuses variétés de grenadiers au Maroc. *P. granatum* présente également une importante synonymie dans laquelle le même génotype est connu sous différents noms dans différentes régions.

Le fruit de la grenade a récemment fait l'objet d'un grand intérêt dans le monde de recherche. Bien qu'il soit consommé généralement en tant que fruit frais, il est également destiné pour la transformation : jus frais, boissons en conserve, boissons alcoolisées et gelées, boissons aromatisées et colorées. Les parties comestibles du fruit de la grenade sont appelées arilles, elles contiennent de grandes quantités d'acides organiques, de sucres, de minéraux, de

vitamines et de polyphénols, présentant une forte activité antioxydante et plusieurs effets bénéfiques pour la santé (Caruso et al., 2020). Des études épidémiologiques récentes ont montrées que certains composés chimiques contenus dans le jus de grenade possèdent une activité antioxydante élevée (Derakhshan et al., 2018; Kalaycıoğlu & Erım, 2017; Kojadinovic et al., 2017; Kostka et al., 2020), et sont capables de réduire la pression artérielle et l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et par la suite prévenir l'apparition de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Caruso et al., 2020; Razani et al., 2017). L'écorce de grenade est généralement la partie non comestible du fruit, mais elle est riche en composés phénoliques qui présentent diverses activités biologiques, comme l'inhibition de la formation des radicaux libres, l'inhibition de l'oxydation et la croissance microbienne et la diminution du risque de maladies cardio et cérébro-vasculaires et de certains types de cancers (Caruso et al., 2020; Song et al., 2016). Aussi, de nombreux chercheurs ont montré que les extraits d'écorce de grenade peuvent être utilisés pour prévenir et/ou guérir l'athérosclérose, la diarrhée, et l'ulcère gastrique (Caruso et al., 2020).

Les différentes études ont rapporté les propriétés physicochimiques, la qualité nutritionnelle et l'activité antioxydante des variétés de grenade cultivées dans différentes parties du monde comme Oman (Saad et al., 2021; Subash et al., 2014), l'Iran (Derakhshan et al., 2018), la Turquie (Oguzhan Caliskan & Bayazit, 2012; Orak et al., 2012), l'Espagne (Fernandes et al., 2017; Melgarejo-Sánchez et al., 2015), l'Italie (Di Stefano et al., 2019; Elshafie et al., 2021; Morittu et al., 2020; Passafiume et al., 2019), l'Allemand (Kostka et al., 2020), le Portugal (Yu et al., 2021), la Grèce (Karapetsi et al., 2021), l'Algérie (Zeghad et al., 2019), la Tunisie (Abid et al., 2017; Boussaa et al., 2019), l'Egypte (Farag et al., 2020) et l'Inde (Sharma & Es, 2018). Bien que la littérature contienne un grand nombre de recherche sur les caractéristiques biochimiques, phytochimiques de la grenade et leur effet bénéfique pour la santé, il semble y avoir un manque de données scientifiques sur la grenade cultivée dans les conditions climatiques du Maroc. Par conséquent, la présente étude s'est concentrée sur la caractérisation d'une variété locale du grenadier « Sefri » afin de déterminer les propriétés biochimiques, phytochimiques et antioxydantes du fruit. Le grenadier « Sefri » d'Ouled Abdellah, région de Béni Mellal, qui doit son nom à la couleur jaune de ses écorces, jouit d'une notoriété nationale en raison des caractéristiques organoleptiques de ses fruits, spécifique à la région. Malgré ses bénéfices, la variété « Sefri » reste peu étudiée au Maroc. Toutefois, le but de ce présent travail s'intéresse à l'analyse des caractéristiques phytochimiques et biochimiques ainsi qu'évaluer l'activité antioxydante des extraits du

grenadier « Sefri » d'Ouled Abdellah; et par la suite ces aspects contribuent à la valorisation alimentaire de cette variété.

2 Résultats

2.1 Caractéristiques pomologiques

Les caractéristiques pomologiques du cultivar de grenadier étudié (Sefri), sont présentées dans le **Tableau 4**:

Tableau 4: Caractéristiques pomologiques du grenadier Sefri

Cultivar	Poids des fruits (g)	Poids des arilles (g)	Poids de l'écorce (g)	Poids des pépins (g)
Sefri	473.82 ± 37.50	250.02 ± 30.60	168.78 ± 20.40	59.08 ± 13.04

Nous constatons d'après le **Tableau 4** que le poids moyen des grenades du cultivar «Sefri » était de 473.82 g, ceci les classent comme de moyenne taille selon les critères utilisés par Martinez et al. (Martínez et al., 2006), pour les cultivars espagnols. Notons également que le poids moyen en arilles, en pépins et en écorces est de l'ordre de 250.02 g, 59.08 g et 168.78 g, respectivement.

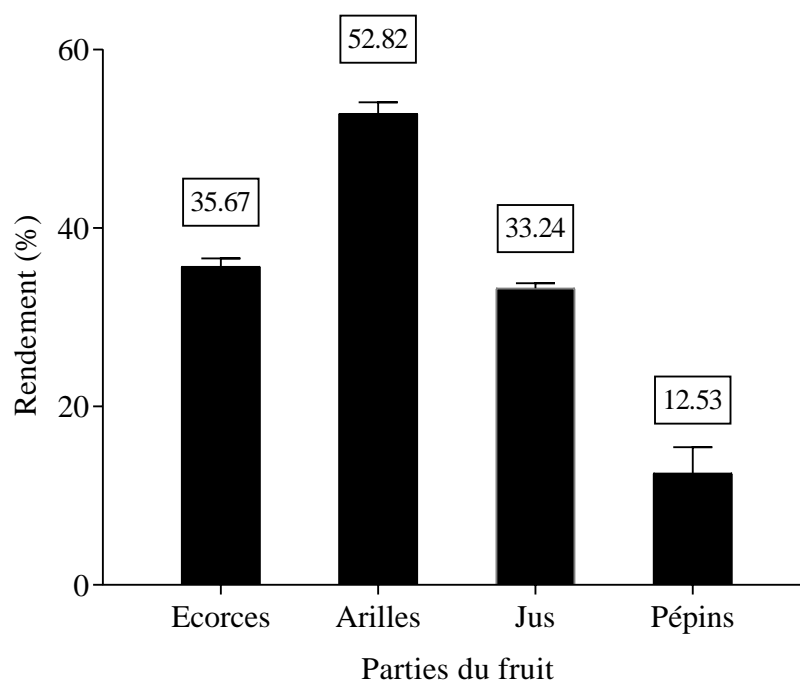


Figure 22: Rendement en écorces, en arilles, en jus et en pépins.

Par ailleurs, la partie comestible du fruit de *Punica granatum* représente 52.82 % du poids total, avec 33.24 % de jus et 12.53 % des pépins. Alors que la partie non comestible représente 35.67 % du poids des fruits (**Figure 22**).

2.2 Rendement des extractions

Les écorces et les arilles de grenade de la variété Sefri ont été soumis à une extraction en utilisant le méthanol. Les résultats des rendements d'extraction sont présentés dans la **Figure 23**.

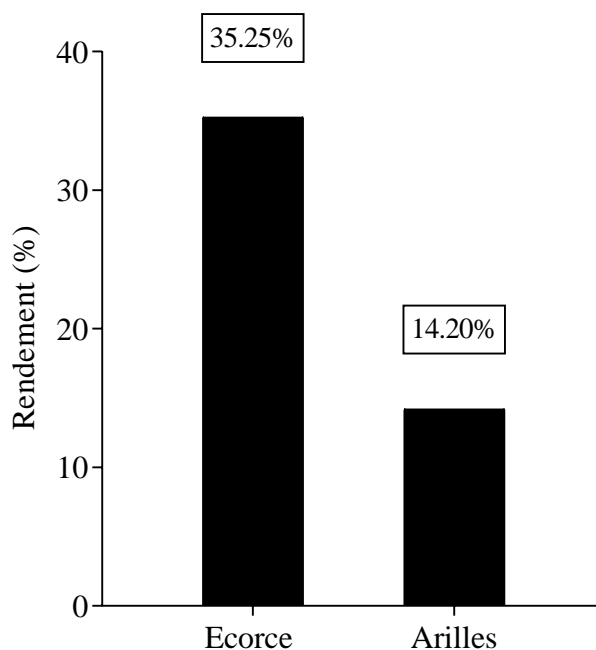


Figure 23: Rendements des extractions (en %).

Comme l'indique la **Figure 23**, et à travers les valeurs du rendement d'extraction, on peut remarquer que l'extrait phénolique de l'écorce a donné le meilleur rendement (35.25 %), par rapport à l'extrait des arilles (14.20%).

2.3 Analyse qualitative (Criblage phytochimique)

Les substances phytochimiques sont des produits chimiques dérivés des plantes et le terme est souvent utilisé pour décrire un grand nombre de composés métaboliques secondaires présents dans les plantes. Le test de criblage phytochimique est une procédure simple et rapide qui donne une idée sur les différents types de composés phytochimiques présents dans un mélange et est considéré comme un outil important dans les analyses de composés bioactifs.

Les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles du grenadier ont été testés pour les constituants phytochimiques les plus courants. Il s'agit notamment des alcaloïdes, des

flavonoïdes, des tanins, des stéroïdes, des saponines, des glycosides, des carbohydrates, des protéines, des acides aminés, des lipides et des phytostéroles. Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques effectués sur les différents extraits du grenadier sont indiqués dans le **Tableau 5**.

Tableau 5: Résultats du criblage phytochimique des extraits du grenadier

Composés	Tests phytochimiques	Écorce	Arilles
Alcaloïdes	Test de Dragendorff	+++	+++
Flavonoïdes	Test d'acétate de plomb	+++	+++
Tanins	Test de gélatine	+++	+++
	Test de chlorure de fer	+++	+++
Stéroïdes et tritérpénoïdes	Test de Salkowski	+++	+++
Saponines	Indice de mousse	++	+
Glycosides anthraquinones		+	+
Carbohydrates	Test de Fehling	+	++
	Test de Molish	++	+++
Protéines	Test de Biuret	-	-
Acides aminés	Test de ninhydrine	-	+++
Lipides et huiles fixes		-	-
Glycosides cardiotoniques	Test de Keller-Killiani	++	+
Phytostéroles	Test de Libermann-Burchard	-	-

Elevé (+++), Modéré (++) , bas (+), nul (-).

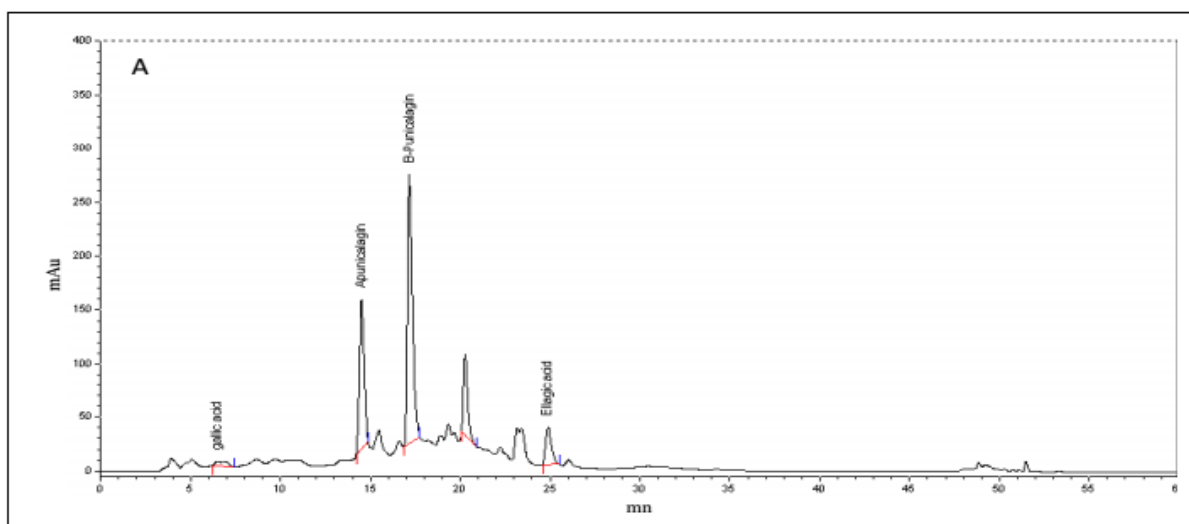
Les résultats sont classés comme suit ; élevé (+++), modéré (++) , bas (+) et nul (-) en se basant sur l'intensité du produit de la réaction coloré. Les résultats du criblage phytochimique ont montré que les substances phytochimiques les plus abondantes étaient les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, et les stéroïdes. Le test de Dragendorff, d'acétate de plomb, de gélatine et de chlorure de fer, et le test de Salkowski ont révélés la présence de ces substances phytochimiques avec une quantité élevée dans les deux extraits. Pour ce qui est des deux tests à savoir le test de l'indice de mousse pour la caractérisation des saponines, et le test de Keller-

Killiani pour les glycosides cardiotoniques; ces derniers se sont révélés positifs dans tous les extraits avec une quantité modérée pour l'extrait de l'écorce et faible pour ce qui est des arilles.

Le test de Libermann-Burchard pour les phytostérols, le test de Biuret pour la révélation des protéines, et le test des lipides et des huiles fixes était négatif pour les deux extraits (écorce et arilles). Le test des glycosides anthroquinones était positif avec une quantité faible pour les deux extraits. Les tests de Molisch et de Fehling ont indiqué la présence de carbohydrates dans tous les extraits avec une quantité plus élevée pour les arilles en comparaison avec l'extrait de l'écorce. Quant au test de ninhydrine, il a été positif uniquement dans les extraits des arilles avec la présence d'une quantité élevée des acides aminés. En conclusion, l'étude phytochimique a montré que les différents extraits du grenadier (*Punica granatum* L.) à savoir l'écorce ou les arilles sont riches en métabolites secondaires, notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, et les stéroïdes. La présence de ces différents phytoconstituants peut être responsable des propriétés thérapeutiques de la grenade.

2.4 Examen du profil chromatographique des extraits phénoliques du grenadier par HPLC-DAD-UV

Une identification préliminaire du profil de chacun des extraits phénoliques du grenadier a été réalisée à l'aide de la Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP) avec une double détection UV (200, 400 nm) en présence d'une série de témoins (4 acides phénoliques). L'analyse par CLHP-DAD-UV des extraits phénoliques de l'écorce (**Figure 24. A**) et des arilles (**Figure 24. B**) du grenadier *Punica granatum*, montre la présence de certains des acides phénoliques et flavonoïdes utilisés comme témoins. C'est le cas de l'acide gallique, l' α -punicalagine, β -punicalagine, et l'acide ellagique.



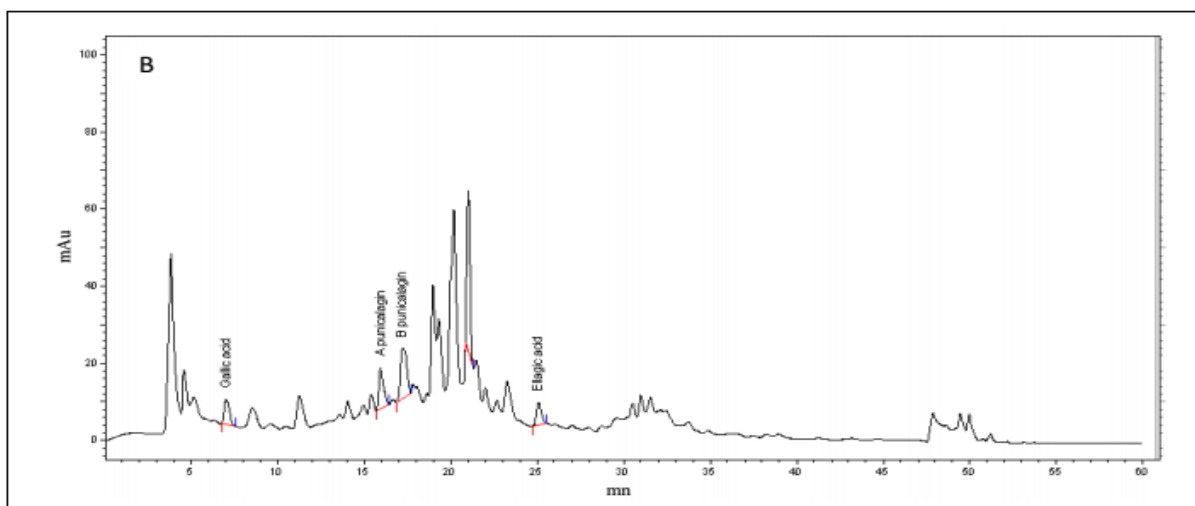


Figure 24: Tracé chromatographique de principales molécules bioactives détectées dans l'extrait phénolique de l'écorce (A) et des arilles (B) du grenadier « Sefri ».

Légende : 1 acide gallique, 2 α -punicalagine, 3 β -punicalagine, et 4 acide ellagique.

Les ellagitannins sont considérés comme les polyphénols les plus abondants dans l'écorce de la grenade, leur teneur peut atteindre 66% des polyphénols totaux de l'écorce (Sun et al., 2017). La caractérisation des composés phénoliques présents dans les extraits phénoliques de la grenade a été réalisée par CLHP-DAD-UV. Nous avons quantifié les isomères de punicalagine (α et β), l'acide ellagique et l'acide gallique et on a comparé les résultats avec des standards de référence. L'analyse qualitative-quantitative des isomères de la punicalagine, de l'acide gallique et de l'acide ellagique a montré que les concentrations de ces composés polyphénoliques étaient plus faibles dans les arilles que dans l'écorce (**Tableau 6**). De plus, les schémas chromatographiques de la fraction phénolique montrent une dominance de la punicalagine- β et de la punicalagine- α par rapport aux autres composés phénoliques, aussi bien dans l'extrait de l'écorce que dans celui des arilles (**Figure 24**). Les temps de rétention de l'acide gallique, de la punicalagine α , de la punicalagine β et de l'acide ellagique étaient de 5,32, 14,42, 16,84 et 23,45 minutes respectivement.

Tableau 6: Compositions et concentrations phénoliques des extraits du grenadier

Composés phénoliques (mg/g d'extrait sec)	Écorce	Arilles
Acide gallique	5.87 ± 0.08	3.88 ± 0.04
α-Punicalagine	148.95 ± 2.43***	40.40 ± 2.67
β-Punicalagine	302.38 ± 7.26***	3.03 ± 0.44
Acide ellagique	18.85 ± 0.41	14.43 ± 0.21

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative par rapport au contrôle.

2.5 Détermination de la composition minérale des extraits phénoliques du grenadier par ICP-AES

Les régimes alimentaires de la population mondiale manquent d'un ou plusieurs éléments minéraux essentiels. Afin de maintenir une bonne santé, les gens ont besoin des aliments riches en minéraux qui doivent être inclus dans leur régime alimentaire. Les minéraux, à savoir le fer (Fe), le zinc (Zn), le calcium (Ca), le potassium (K) et le magnésium (Mg), sont classés comme des composants de haute priorité pour la supplémentation nutritionnelle. Ils sont considérés comme des éléments essentiels au maintien des activités métaboliques dans l'organisme, ainsi qu'aux fonctions de régulation, notamment le transport de l'oxygène, la pression osmotique, l'activité enzymatique, la transmission neuromusculaire et la contraction du muscle cardiaque. La composition minérale des extraits riches en composés phénoliques des écorces et des arilles de la grenade « Sefri » est présentée dans le **Tableau 7**.

Tableau 7: Composition minérale des extraits de *Punica granatum* (mg/Kg d'extrait sec)

Éléments	Concentration (mg/Kg)	
	Écorce	Arilles
Éléments majeurs		
P	39.535 ± 0.077	47.71 ± 2.70
K	164.915 ± 2.411	155.015 ± 2.552
Ca	1325.95 ± 286.392	1106.75 ± 61.94
Mg	97.69 ± 18.922	89.015 ± 5.989
Na	2515.485 ± 104.658	2390.04 ± 281.23
Éléments en trace		
Cr	5.09 ± 0.509	5.075 ± 0.190
Mn	2.38 ± 0.593	2.79 ± 0.28
Fe	99.135 ± 17.189	99.635 ± 12.848

Cu	76.33 ± 71.050	78.445 ± 82.441
Zn	106.715 ± 9.722	130.67 ± 29.67
Se	13.015 ± 2.397	7.73 ± 3.43
Co	3.655 ± 0.021	3.805 ± 0.176
Cd	ND	ND

ND : non détecté. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem, Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions de chaque échantillon.

Les résultats du **Tableau 7** et la **Figure 25** montrent que les extraits de l'écorce et des arilles de grenade Sefri sont particulièrement riches en sodium (Na) et en calcium (Ca), suivis par le potassium (K), tandis que les teneurs en phosphore (P) et en magnésium (Mg) sont très faibles. Comparé aux arilles, l'extrait phénolique des écorces est significativement plus riche en éléments minéraux majeurs. Nos résultats ont montré que le Zinc (Zn), le Fer (Fe) et le cuivre (Cu) étaient les micro-éléments prédominants dans les extraits de l'écorce et d'arilles de grenade, avec un niveau élevé dans les arilles. Aucune différence n'a été observée pour le reste des oligo-éléments. Il est intéressant de noter que le cadmium (Cd) n'a pas été détecté dans notre échantillon.

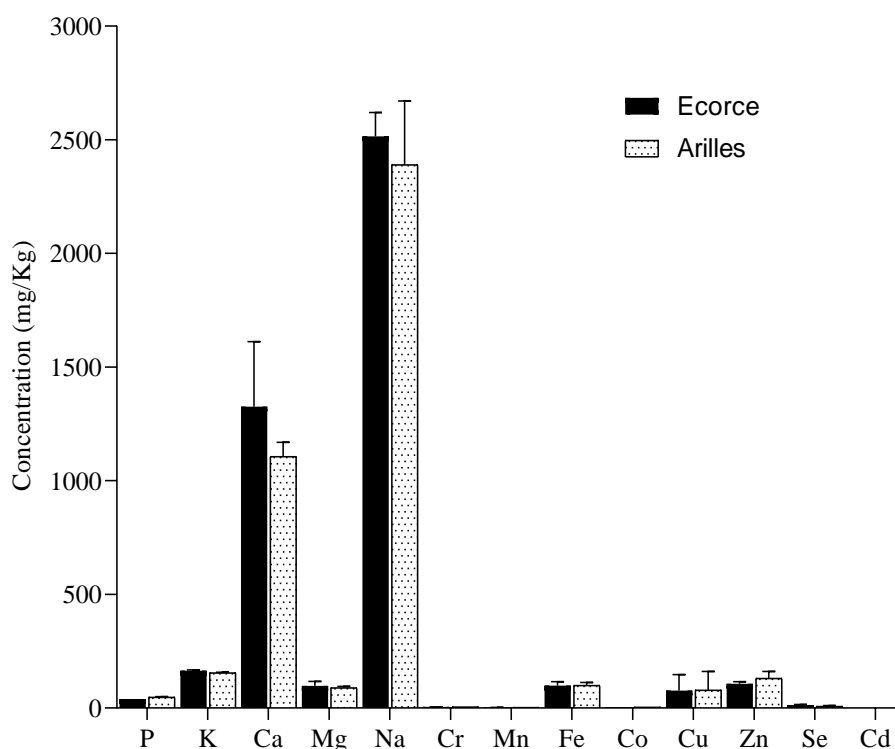


Figure 25: Présentation de la composition en minéraux détectés dans les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles.

2.6 Analyse quantitative

La grenade est l'un des fruits les plus riches en composés phénoliques, à savoir la punicalagine, les anthocyanines et les acides gallique et ellagique. Pourtant, il existe un manque d'informations sur le contenu phénolique de l'écorce et des arilles de la grenade Marocaine « Sefri ». Les études ont montré que le méthanol était le solvant permettant d'obtenir un rendement maximal de l'extrait et un contenu phénolique maximal à partir de différentes parties du fruit. L'analyse quantitative des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles du grenadier a permis de déterminer la teneur en protéines et polyphénols totaux, flavonoïdes, flavonols, tanins condensés et hydrolysables, anthocyanes et en proanthocyanidines. Les courbes d'étalonnages des dosages des composés phénoliques sont présentées dans l'Annexe I.

2.6.1 Détermination de la composition en protéines totales

Les résultats de la détermination des protéines totales par le test de Bradford donnent des estimations des différentes concentrations de protéines dans les échantillons du grenadier en mg/ml, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée du Sérum Albumine Bovine BSA ($y = 1.793 x + 0.05405$, $r^2 = 0.9949$) (Annexe I). Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8: Teneur en protéines totales des extraits phénoliques du grenadier

Extraits	Protéines totales (mg/g)
Extrait phénoliques de l'écorce	0.3474 ± 0.016***
Extrait phénoliques des arilles	0.1892 ± 0.011

*Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. ***p < 0,001 indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).*

En termes de teneur en protéines totales dans les échantillons de *Punica granatum*, les extraits des arilles présentent des concentrations de l'ordre de 0.1892 mg/ml, tandis que la plus forte concentration de protéines totales était présente dans les pelures du grenadier (0.3474 mg/ml) (Figure 26).

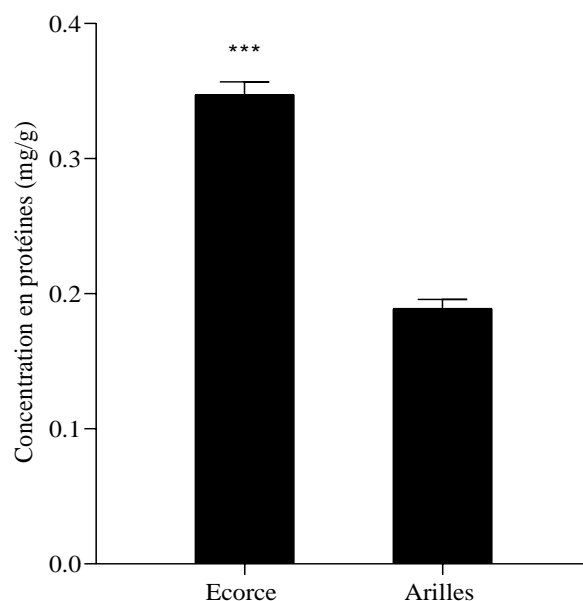


Figure 26: Teneurs en protéines totales des extraits phénoliques du grenadier.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

2.6.2 Teneur en polyphénols totaux

Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau 9** afin de faire une comparaison entre la composition polyphénolique de l'écorce et des arilles. Le tableau représente les teneurs en polyphénols totaux exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique ($y = 0.02662 x - 0.043$, $r^2 = 0.9820$) (**Annexe I**).

Tableau 9: Teneur en polyphénols totaux des extraits phénoliques du grenadier

Extraits	Polyphénols totaux (mg EAG/g)
Extrait phénolique de l'écorce	283.86 \pm 17.89**
Extrait phénolique des arilles	166.90 \pm 18.10

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. ** $p < 0,01$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

A partir des résultats obtenus, nous avons observé des teneurs variées en polyphénols dans les différents extraits de fruit de *P. granatum* (**Figure 27**). La teneur en polyphénols la plus importante a été enregistré pour l'extrait phénolique de l'écorce avec une valeur de

l'ordre de 283.86 ± 17.89 mg EAG/g alors que le contenu était minimum pour l'extrait phénolique des arilles (166.90 ± 18.10 mg EAG /g).

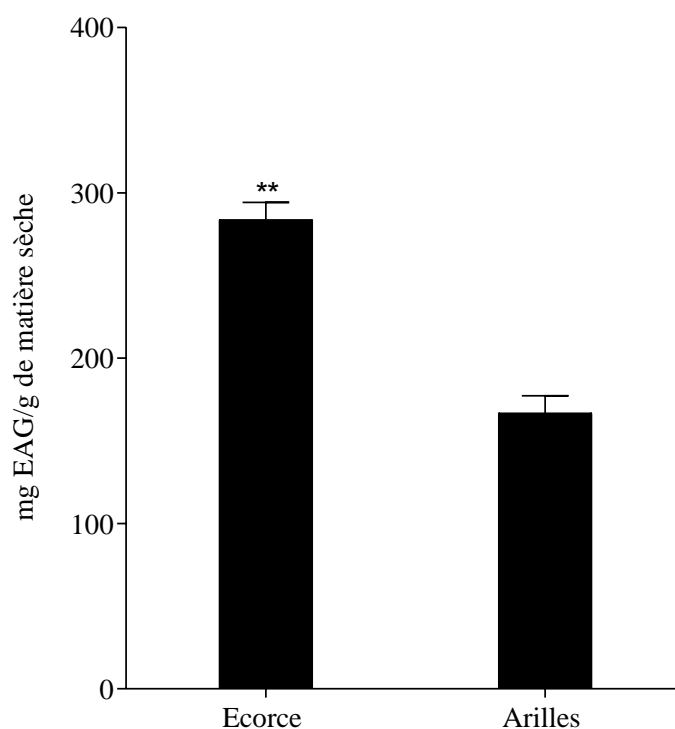


Figure 27: Teneurs en polyphénols totaux des extraits phénoliques du grenadier.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. ****** $p < 0,01$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

2.6.3 Teneur en flavonoïdes totaux

Le **Tableau 10** illustre les teneurs des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles en flavonoïdes (exprimées en mg d'équivalent quercétine par g de matière végétale sèche).

Tableau 10: Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits du grenadier

Extraits	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g)
Extrait phénoliques de l'écorce	$185.37 \pm 3.05^{***}$
Extrait phénoliques des arilles	57.43 ± 0.41

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. ******* $p < 0,001$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

Comme le montre le **Tableau 10**, une différence dans la teneur en flavonoïdes a été observée entre les extraits étudiés ; elle varie entre 185.37 mg EQ/g pour l'extrait phénolique de l'écorce et 57.43 mg EQ/g pour l'extrait des arilles (**Figure 28**).

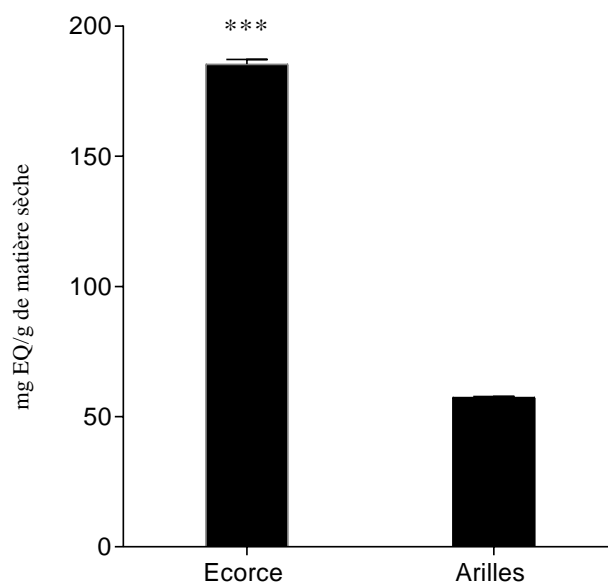


Figure 28: Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits phénoliques du grenadier.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

2.6.4 Teneur en flavonols totaux

Les résultats obtenus pour le dosage des flavonols totaux sont présentés dans le **Tableau 11** :

Tableau 11: Teneur en flavonols totaux des différents extraits du grenadier

Extraits	Flavonols totaux (mg EQ/g)
Extrait phénolique de l'écorce	41.48 \pm 1.14***
Extrait phénolique des arilles	12.74 \pm 0.50

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

Comme indiqué dans le **Tableau 11**, une différence significative dans la teneur en flavonols totaux a été observée entre les extraits étudiés ; elle varie entre 39.59 mg EQ/g pour l'extrait phénolique de l'écorce et 7.06 mg EQ/g pour l'extrait des arilles (**Figure 29**).

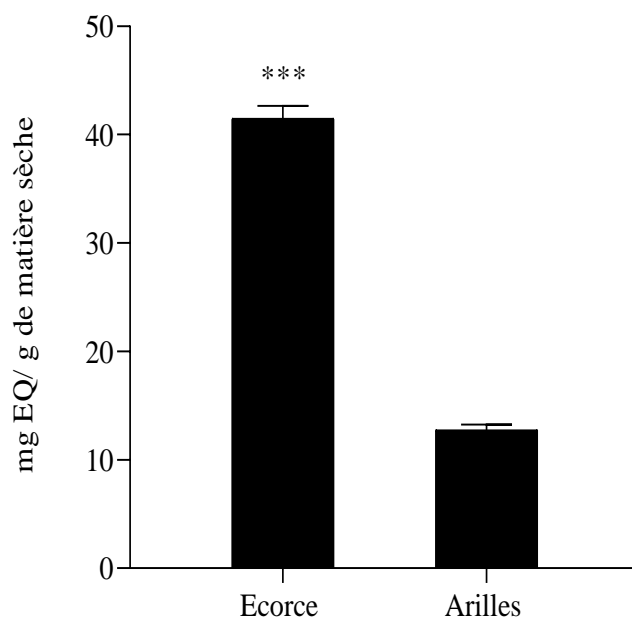


Figure 29: Teneurs en flavonols totaux des extraits phénoliques du grenadier.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique des différences significatives entre les deux groupes (écorce et arilles).

2.6.5 Teneur en tanins hydrolysables et condensés

Les résultats obtenus pour les tanins hydrolysables et condensés sont présentés dans le **Tableau 12** :

Tableau 12: Teneur en tanins hydrolysables et condensés des extraits phénoliques

Extraits	Teneur en tanins hydrolysables (mg EAT/g)	Teneur en tanins condensés (mg EC/g)
Extrait phénolique de l'écorce	391.90 \pm 1.79***	84.85 \pm 3.27***
Extrait phénolique des arilles	107.75 \pm 3.38	116.85 \pm 0.56

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

Les résultats de l'analyse quantitative par spectrophotomètre UV-visible montre que les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de fruit de *Punica granatum* étudiée, sont riches en tanins hydrolysables. Cette teneur varie de 391.90 \pm 1.79 mg EAT/g à 107.75 \pm 3.38 mg EAT/g pour l'extrait phénolique de l'écorce et des arilles respectivement (**Figure 30 B**). Nous constatons également que les arilles renferment une teneur plus élevée en tanins condensés

(116.85 ± 0.56 mg EC/g). Alors que pour l'extrait phénolique de l'écorce, elle est de l'ordre de 84.85 ± 3.27 mg EC/g d'extrait (**Figure 30 A**).

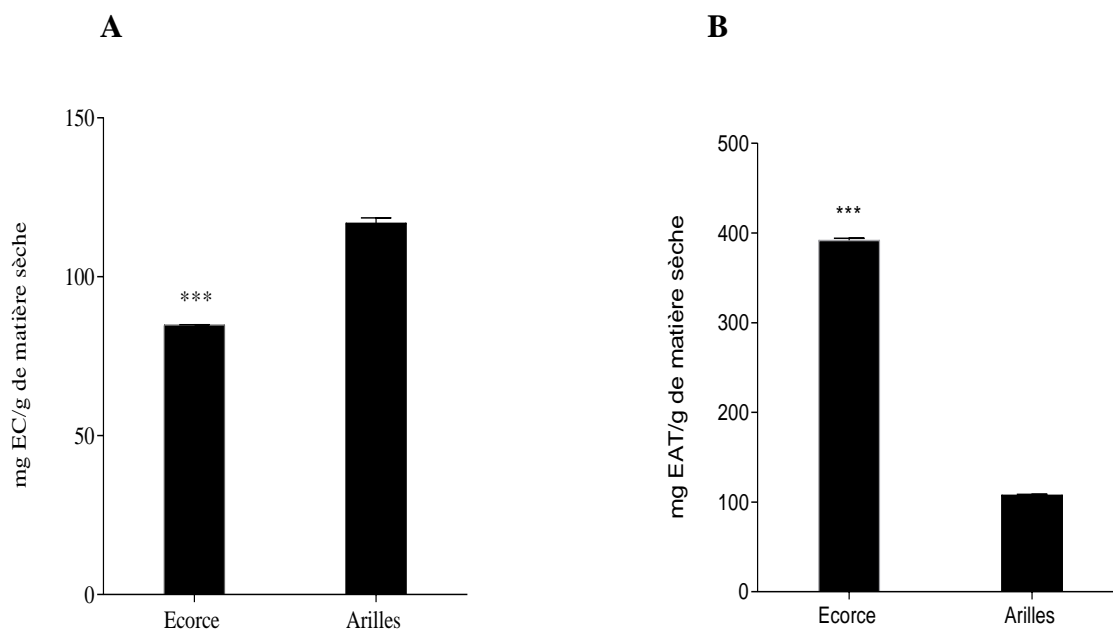


Figure 30: Teneur en tanins condensés (A) et hydrolysables (B).

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

2.6.6 Teneur en anthocyanosides

Les teneurs des extraits phénoliques du grenadier en anthocyanines exprimées en mg d'équivalent cyanidine-3-glucoside par 100 g d'extrait sec sont présentées dans le **Tableau 13**:

Tableau 13: Teneur en anthocyanosides des extraits phénoliques du grenadier

Extraits	Anthocyanosides (mg cyanidine-3-glucoside/100 g)
Extrait phénolique de l'écorce	102.97 ± 0.42 ^{ns}
Extrait phénolique des arilles	81.26 ± 0.34

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. ns : non significatif.

La teneur en anthocyanines la plus élevée a été déterminée dans l'extrait de l'écorce qui est de l'ordre de 102.97 mg cyanidin-3-glucoside/100 g. Alors que le contenu en anthocyanes

pour l'extrait phénolique des arilles est plus en moins faible (81.26 mg cyanidin-3-glucoside/100 g) (**Figure 31**).

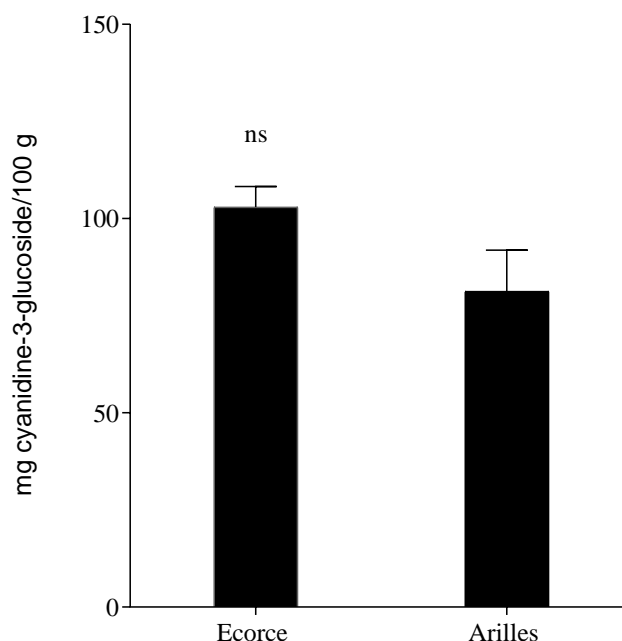


Figure 31: Teneur en anthocyanosides totaux des extraits phénoliques.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. ns : non significatif.

2.6.7 Teneur en proanthocyanidines

Les teneurs totales en proanthocyanidines des extraits phénoliques de *Punica granatum* sont représentées dans le **Tableau 14** :

Tableau 14: Teneur en proanthocyanidines des extraits phénoliques du grenadier

Extraits	Proanthocyanidines (mg EC/g)
Extrait phénolique de l'écorce	4.79 \pm 0.09***
Extrait phénolique des arilles	3.87 \pm 0.03

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

L'estimation quantitative de la teneur totale en proanthocyanidines des extraits phénoliques du cultivar de grenadier «Sefri » testé (**Tableau 14**), montre que l'extrait phénolique des arilles contient une concentration plus ou moins faible en proanthocyanidines (3.87 mg EC/g de matière sèche) comparé à l'extrait de l'écorce (4.79 mg EC/g) (**Figure 32**).

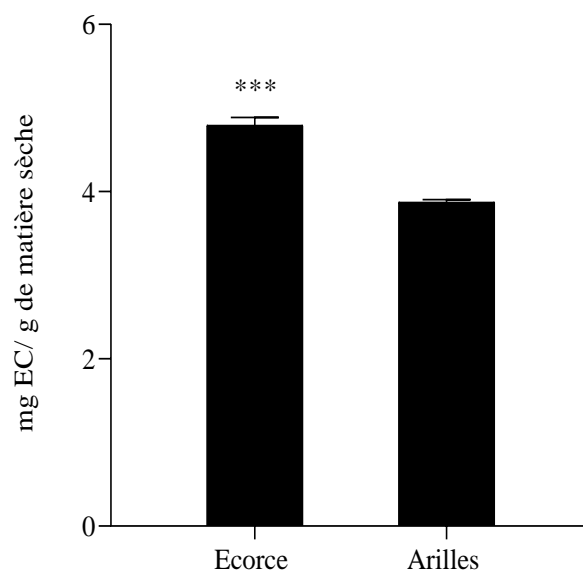


Figure 32: Teneurs en proanthocyanidines des extraits phénoliques du grenadier.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique des différences significatives entre les deux groupes (écorce et arilles).

2.7 Activité antioxydante des extraits phénoliques du grenadier

2.7.1 Piégeage du radical libre DPPH•

La **Figure 33** illustre l'efficacité des extraits de *Punica granatum* à piéger le radical libre DPPH•, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations. D'après les résultats, l'évolution de l'activité anti-radicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.

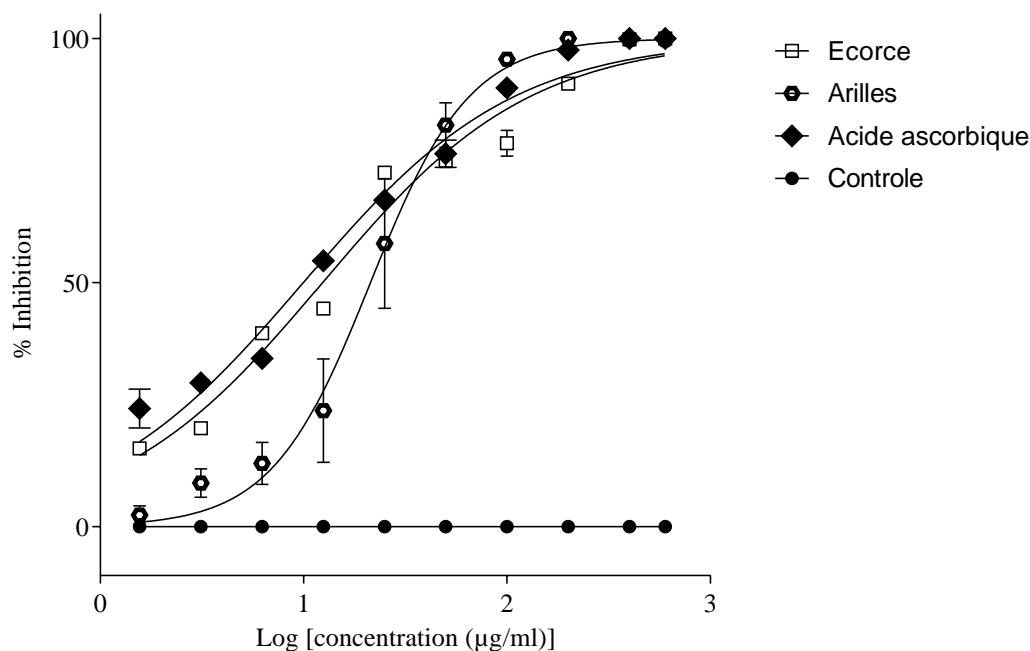


Figure 33: Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du grenadier et de l'acide ascorbique par la méthode du piégeage du radical libre DPPH[•].

Il ressort de ces résultats que le pouvoir de piégeage du radical DPPH[•] est dépendant de la concentration. Le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement total du DPPH présent dans le milieu.

Dans ce présent travail, nous avons comparé l'activité antioxydante des extraits phénoliques du grenadier à celle d'un antioxydant de référence synthétique à savoir l'acide ascorbique (Vitamine C). D'après la **Figure 33**, nous remarquons que les différents extraits phénoliques de l'écorce et des arilles (EPE et EPA) ont montré une activité antioxydante très importante vis-à-vis du piégeage du radical DPPH[•]. Nous constatons également que pour ces extraits organiques, des pourcentages d'inhibition importants ont été atteints avec présence d'une phase stationnaire (saturation). Les pourcentages d'inhibition trouvés étaient de l'ordre de 96.28 % pour l'extrait phénolique de l'écorce, à une concentration de 0.06 mg/ml alors qu'il était de l'ordre de 93.90 % pour l'extrait phénolique des arilles à la même concentration. De plus, le pourcentage d'inhibition de l'écorce de *Punica granatum* à des concentrations minimales (0.0025 et 0.0050 mg/ml) variait de 69.80 à 72.13% dépassant ainsi les 50% d'activité ; même chose pour les extraits phénoliques des arilles dont le pourcentage d'inhibition aux mêmes concentrations varient de 54.13 à 77.42 %. Quant au contrôle positif utilisé, nous avons remarqué une forte activité antioxydante traduite par des pourcentages

d'inhibition élevés et ce même à de très faibles concentrations. A une concentration de 0.0025 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique (Vitamine C) vis-à-vis du radical DPPH[•] est de l'ordre de 36.89%. Toutefois, il est nettement inférieur aux pourcentages d'inhibition de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri » qui est de l'ordre de 69.80% et 54.13% respectivement. Pour faire une étude comparative de l'activité antioxydante de tous les composés, nous avons déterminé la valeur de la concentration inhibitrice (IC₅₀) qui donne 50% de l'activité de piégeage du radical libre DPPH[•] correspondant respectivement à la Vitamine C, et les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles (EPE et EPA). Ces derniers sont regroupés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15: Concentration inhibitrice IC₅₀ (µg/ml) du radical DPPH[•]

	EPE	EPA	Vitamine C
IC ₅₀ (µg/ml)	12.49 ± 0.60 ***	21.58 ± 4.44***	16.68 ± 0.43

*Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. ***p < 0,001 indique une différence significative par rapport au contrôle positif (acide ascorbique).*

La valeur IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (Activité antioxydante I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu réactionnel. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité anti-radicalaire d'un composé est appréciable.

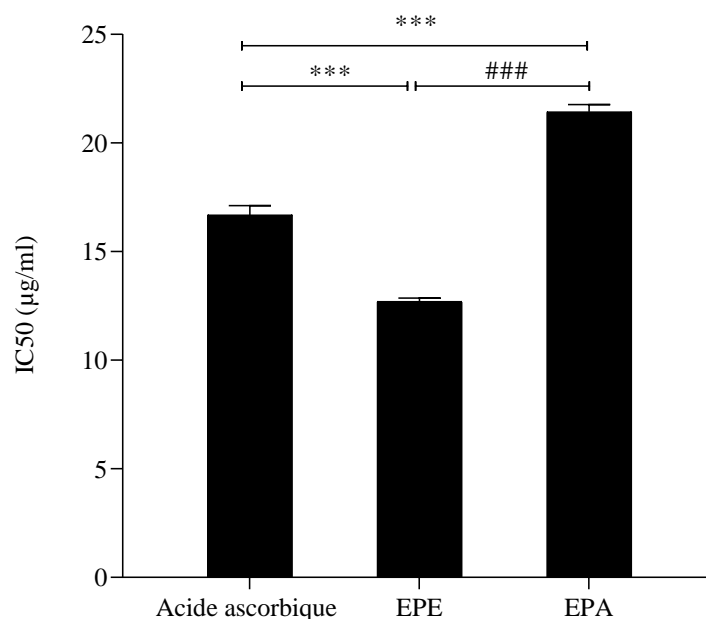


Figure 34: Concentration inhibitrice IC₅₀ du radical DPPH• des différents extraits du grenadier et de l'acide ascorbique.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative par rapport au contrôle positif (acide ascorbique) et ### $p < 0,001$ indique une différence significative entre EPE et EPA.

L'analyse du **Tableau 15** et de la **Figure 34**, montre que l'extrait phénolique de l'écorce du fruit de *Punica granatum* présente une faible valeur d'IC₅₀ inférieure à celle de l'acide ascorbique. Cela signifie que son pouvoir antioxydant est plus puissant que celui de l'antioxydant de référence (Vitamine C). Nous citons, l'extrait phénolique des arilles et de l'acide ascorbique qui ont exprimé des IC₅₀ de l'ordre de 21.58, et 16.68 µg/ml, respectivement. Alors que pour l'extrait de l'écorce, un important pouvoir antioxydant qui se traduit par une valeur de la IC₅₀ de l'ordre de 12.49 µg/ml a été enregistré. Nous pouvons dire que l'écorce du fruit de *Punica granatum* est un puissant antioxydant naturel.

2.7.2 Piégeage du radical ABTS•

Dans notre étude, nous avons choisi la méthode du piégeage du radical ABTS• pour déterminer l'activité antioxydante des extraits phénoliques de grenade. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 35**, qui illustre l'efficacité de l'écorce et des arilles de *Punica granatum* à piéger le radical ABTS en fonction des différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I %) du radical ABTS• et comparés à la molécule de référence (acide ascorbique). D'après les résultats obtenus, on peut remarquer que la variation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques du grenadier augmente avec

l'augmentation des différentes concentrations des échantillons dans le milieu réactionnel, on peut dire que l'activité anti-radicalaire de notre plante est dose-dépendante.

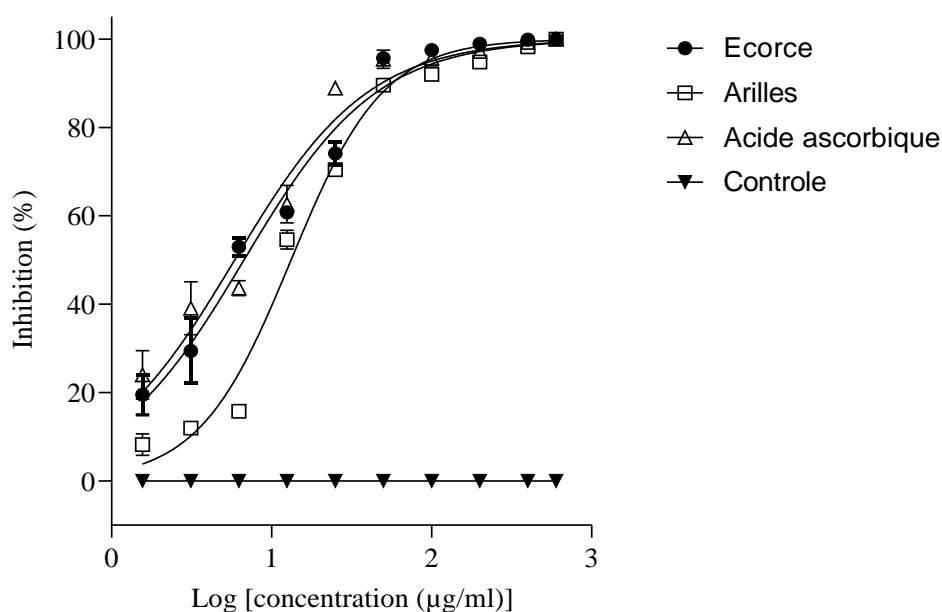


Figure 35: Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du grenadier et de l'acide ascorbique par la méthode du piégeage du radical ABTS[•].

D'après les résultats indiqués dans la **Figure 35**, nous constatons que le pouvoir de piégeage du radical ABTS[•] est dépendant de la concentration. Le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement presque total du radical ABTS présent dans le milieu.

Dans cette étude, nous avons identifié le pouvoir anti-radicalaire des extraits phénoliques de grenade vis-à-vis du radical libre ABTS[•] à une gamme de concentration de 0.001 à 0.6 mg/ml, en le comparant à ceux d'un antioxydant de référence synthétique à savoir l'acide ascorbique (Vitamine C) aux mêmes concentrations. La capacité des composés phénoliques à pouvoir antioxydant dans les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade à inhiber le radical libre ABTS[•] a montré une activité antioxydante très importante vis-à-vis du piégeage du radical ABTS[•], et que cette activité est dépendante de la concentration. Comme la montre la **Figure 35**, l'acide ascorbique a montré la plus forte activité d'inhibition du radical ABTS[•] à des concentrations minimales, tandis que l'activité d'inhibition des extraits phénoliques de pelures était proche de celui de l'acide ascorbique, en revanche l'activité anti-radicalaire des extraits phénoliques des graines de grenade était plus faible. A fortes concentrations, nous remarquons également que pour ces extraits phénoliques, des

pourcentages d'inhibition plus élevés ont été atteints avec présence d'une phase stationnaire (saturation). L'activité d'inhibition du radical libre ABTS• des extraits d'écorce étaient de l'ordre de 98.71 % à une concentration de 0.6 mg/ml alors qu'il était de l'ordre de 95.75 % pour l'extrait phénolique des arilles à la même concentration. Comparé à l'extrait phénolique des graines de grenade, l'extrait d'écorce a présenté une activité d'inhibition plus élevée à des concentrations minimales d'extrait (0.0012 et 0.0025 mg/ml), le pourcentage d'inhibition variait de 59.99 à 73.18 % dépassant ainsi les 50% d'activité ; tandis que le pourcentage d'inhibition des arilles varie de 52.28 à 67.47 % aux mêmes concentrations. Quant au standard utilisé, nous avons remarqué une forte activité antioxydante traduite par des pourcentages d'inhibition élevés à de très faibles concentrations. Le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique (Vitamine C) vis-à-vis du radical libre ABTS• est de l'ordre de 94.18 % à une concentration minimale de 0.005 mg/ml. Toutefois, il est nettement proche au pourcentage d'inhibition de l'écorce de la grenade « Sefri » qui est de l'ordre de 94.42 % et supérieur à celui des extraits phénoliques des arilles, qui est de l'ordre de 85.75 %. Pour faire une comparaison entre l'activité anti-radicalaire des différents extraits phénoliques de grenade (EPE et EPA), et l'antioxydant synthétique, nous avons déterminé la valeur de la concentration inhibitrice (IC₅₀) qui donne 50% de l'activité de piégeage du radical libre ABTS•. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 16** et la **Figure 36**.

Tableau 16: Concentration inhibitrice IC₅₀ (µg/ml) du radical ABTS•

	EPE	EPA	Vitamine C
IC ₅₀ (µg/ml)	12.38 ± 0.64*	18.10 ± 0.29***	11.11 ± 0.38

*Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *p < 0,05 et ***p < 0.001 indiquent des différences significatives par rapport au contrôle positif (acide ascorbique).*

La valeur IC₅₀ est inversement liée à l'activité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour piéger 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu réactionnel. Plus la valeur d'IC₅₀ est plus faible, plus l'activité anti-radicalaire d'un composé est plus forte.

Les résultats du **Tableau 16** et de la **Figure 36**, montre que la concentration inhibitrice (IC₅₀) la plus faible a été présentée par l'acide ascorbique, qui était de l'ordre de 11.11 µg/ml, suivis par l'extrait phénolique de l'écorce du fruit de *Punica granatum* qui a présenté une forte capacité antioxydante qui se traduit par une faible valeur d'IC₅₀ (12.38 µg/ml) proche à celle de l'acide ascorbique. Cela signifie que son pouvoir antioxydant est comparable à celui

de l'antioxydant de référence (Vitamine C). Cependant, la concentration inhibitrice de l'extrait phénolique des arilles était plus élevée en comparaison avec l'écorce et l'acide ascorbique et qui était de l'ordre de 18.10 µg/ml. Les résultats suggèrent fortement que les extraits d'écorce et de graines de grenade sont de puissants inhibiteurs naturels du radical libre ABTS[•], plus précisément l'écorce qui possède une activité antioxydante proche de celui de l'antioxydant synthétique (Acide ascorbique).

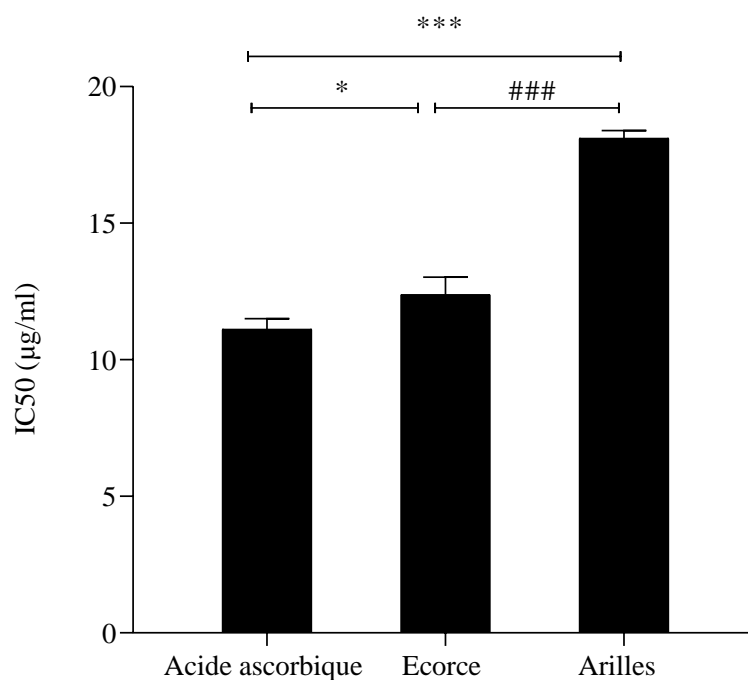


Figure 36: Concentration inhibitrice IC₅₀ du radical ABTS[•] des différents extraits du grenadier et de l'acide ascorbique.

*Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *p<0.05 et ***p < 0,001 indiquent des différences significatives par rapport au contrôle positif. ###p < 0,001 indique une différence significative entre EPE et EPA.*

2.7.3 Piégeage du radical du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

D'après les résultats obtenus dans la **Figure 37**, qui montre l'efficacité des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri » à piéger le radical H₂O₂, on peut remarquer que l'évolution de l'activité antioxydante (traduite par le pourcentage d'inhibition I% en fonction des différentes concentrations) augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits phénoliques du grenadier dans le milieu réactionnel.

A partir de ces résultats on peut remarquer que le pouvoir de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est dépendant de la concentration. Le pourcentage d'inhibition augmente

progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement total du H_2O_2 présent dans le milieu réactionnel.

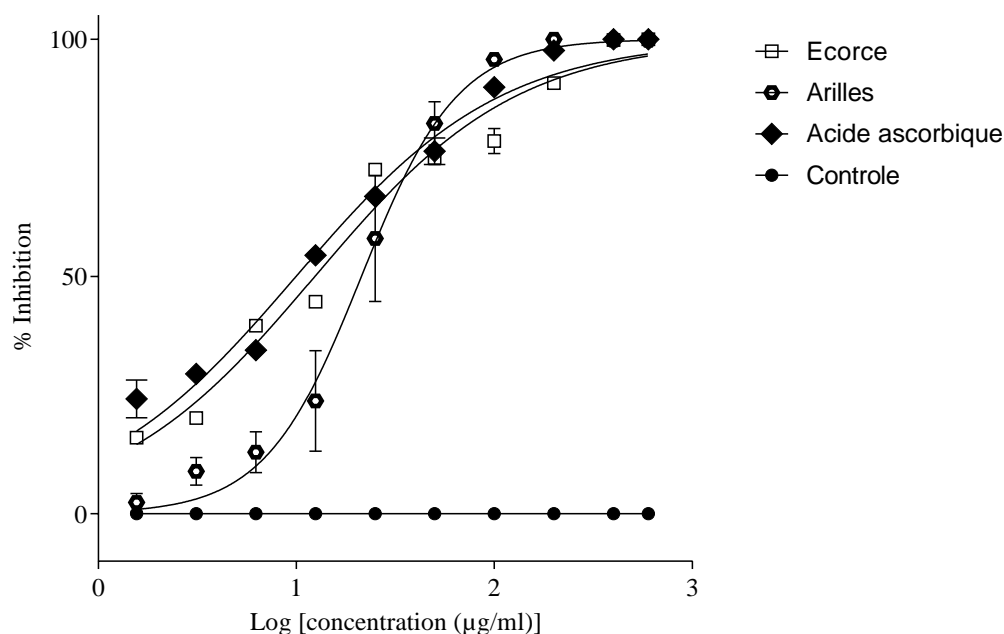


Figure 37: Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du grenadier par la méthode du piégeage du peroxyde d'hydrogène.

Les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade ont été examinés pour leur activité de piégeage *in vitro* en utilisant le peroxyde d'hydrogène et on la comparant avec celle de l'acide ascorbique. Ces extraits organiques testés ont montré une forte activité de piégeage vis-à-vis du radical libre H_2O_2 (**Figure 37**).

D'après la **Figure 37**, nous remarquons que l'extrait phénolique de l'écorce a montré une activité antioxydante très importante vis-à-vis du piégeage du radical libre H_2O_2 , pour ce qui est de l'extrait des arilles, il a exercé un pouvoir antioxydant plus au moins important à des concentrations minimales. À des très faibles concentrations de 0.006 mg/ml à 0.012 mg/ml, nous avons observé une diminution de l'activité du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en fonction de la concentration, le pourcentage d'inhibition de l'écorce de *Punica granatum* variait de 50.05 à 68.17 % dépassant ainsi les 50 % d'activité anti-radicalaire; contrairement aux extraits phénoliques des arilles dont les pourcentages d'inhibition aux mêmes concentrations étaient moins faibles (entre 30.28 % et 48.02 %). À des fortes concentrations, nous constatons également que pour ces extraits phénoliques, des pourcentages d'inhibition importants ont été atteints avec présence d'une phase stationnaire (saturation). Les pourcentages d'inhibitions les plus élevés ont été trouvés à une concentration de l'ordre de 0.6 mg/ml pour tous les

échantillons (**Figure 37**). Le meilleur pourcentage d'activité de piégeage a été montré par l'acide ascorbique ($99,98 \pm 0.005$), suivi par les extraits phénoliques de l'écorce ($99,33 \pm 0.220$). En revanche, l'extrait phénolique des arilles ne dépassait pas les $78,63 \pm 7,038$ % d'activité anti-radicalaire à la même concentration. Quant au contrôle positif utilisé, nous avons remarqué un fort pouvoir antioxydant traduit par des pourcentages d'inhibition élevés et ce même à de très faibles concentrations. A 0.006 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical H_2O_2 est de l'ordre de 68.09% comparativement à celui des extraits phénoliques de la grenade.

L'activité donneuse d'hydrogène, mesurée en utilisant des radicaux de peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'hydrogène, a démontré qu'une forte association pouvait être trouvée entre la concentration des extraits phénoliques de grenade et le taux d'inhibition. En utilisant le test du peroxyde d'hydrogène, les extraits de grenade ont démontré leur capacité à piéger le radical stable.

Pour faire une étude comparative de l'activité anti-radicalaire de tous les composés, nous avons déterminé la valeur de la concentration inhibitrice qui donne 50% de l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 correspondant respectivement à l'extrait méthanolique de l'écorce et des arilles et de l'acide ascorbique. Les résultats obtenus sont indiqués dans le **Tableau 17** et la **Figure 38**.

Tableau 17: Concentration inhibitrice IC₅₀ (µg/ml) du radical H_2O_2

	EPE	EPA	Vitamine C
IC ₅₀ (µg/ml)	$19.96 \pm 0.02^{***}$	$37.06 \pm 0.05^{***}$	16.26 ± 0.14

*Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. $^{***}p < 0,001$ indique une différence significative par rapport au contrôle positif (acide ascorbique).*

Le pouvoir antioxydant d'un composé est le plus souvent évalué par la détermination de la concentration inhibitrice IC₅₀, car elle reflète la concentration d'un antioxydant nécessaire pour neutraliser 50 % de la concentration initiale du radical libre dans le milieu réactionnel. Elle est inversement liée à la capacité anti-radicalaire de l'antioxydant, plus elle est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est plus élevée.

L'analyse du **Tableau 17** et de la **Figure 38**, montre que l'extrait phénolique de l'écorce du fruit de *Punica granatum* présente une plus faible valeur d'IC₅₀. Cela signifie que son pouvoir antioxydant est plus important que celui des extraits phénoliques des arilles. Nous citons, l'extrait phénolique de l'écorce et des arilles qui ont exprimé des IC₅₀ de l'ordre de

19.96 et 37.06 µg/ml, respectivement. Alors que pour le contrôle positif (Vitamine C), un important pouvoir antioxydant qui se traduit par une valeur de la IC₅₀ de l'ordre de 16.26 µg/ml a été enregistré. Nous pouvons dire que l'écorce du fruit de *Punica granatum* est un puissant antioxydant naturel puisqu'il possède une forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du piégeage du radical peroxyde d'hydrogène.

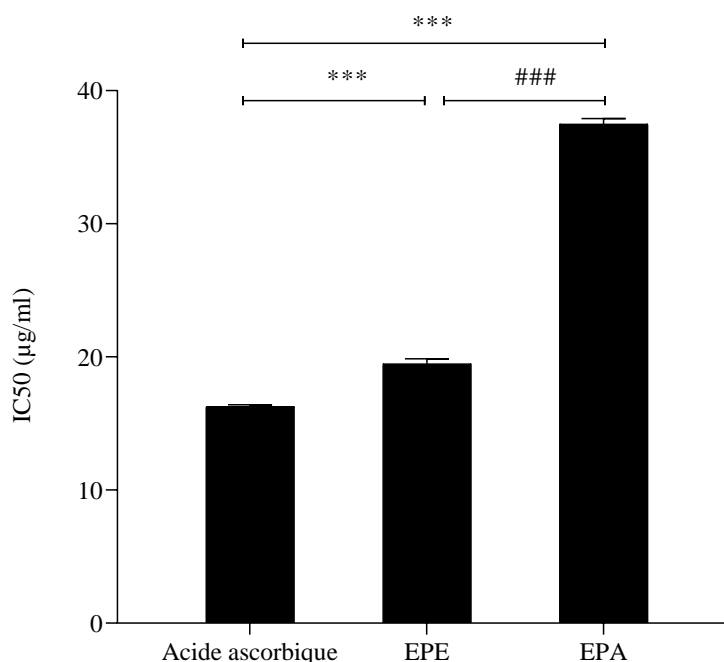


Figure 38: Concentration inhibitrice IC₅₀ du radical H₂O₂ des différents extraits du grenadier et l'antioxydant de référence.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0.001$ indique une différence significative par rapport au contrôle positif (acide ascorbique). ### $p < 0.001$ indique une différence significative entre EPE et EPA.

2.7.4 Activité antioxydante totale (AAT)

L'activité antioxydante totale des extraits a été mesurée par spectrophotométrie à l'aide de la méthode du phosphomolybdène, qui est basée sur la réduction ultérieure de Mo(VI) en Mo(V) par les composés antioxydants à un pH acide, avec la formation d'un complexe phosphate vert avec une absorption maximale à 695 nm. Plus l'absorbance est élevée, plus l'activité antioxydante est forte (**Figure 39**).

Les résultats obtenus de l'activité antioxydante totale des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade et aussi de l'acide ascorbique (standard interne) sont mentionnés dans la **Figure 39**. L'activité antioxydante totale de l'extrait de l'écorce est beaucoup plus élevée

que celle des arilles, mais légèrement inférieure à celle de l'acide ascorbique pour les concentrations faibles et plus élevée pour les concentrations les plus élevée (0.4 et 0.6 mg/ml).

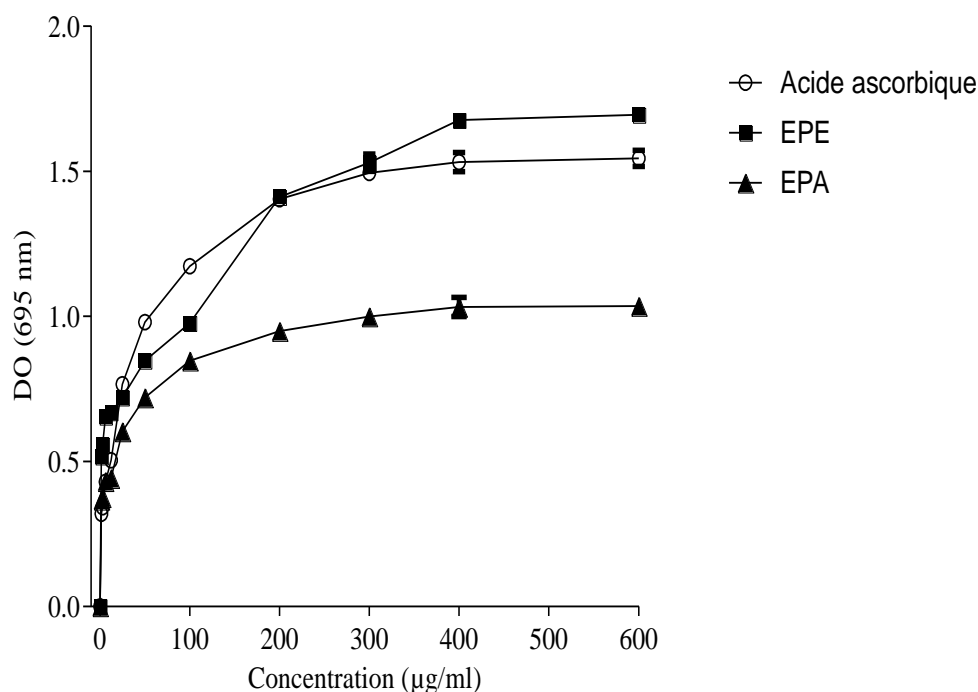


Figure 39: Évaluation des absorbances des différents extraits phénoliques de grenade et de l'acide ascorbique en fonction des concentrations dans le test de l'activité antioxydante totale.

Les analyses de l'activité antioxydante totale (AAT) ont montré que tous les extraits de grenade testés présentaient une activité antioxydante importante. Les extraits phénoliques des arilles et de l'écorce du grenadier ont été capables de réduire le Mo (VI) en Mo (V). La **Figure 40**, présente la capacité antioxydante des différents extraits de l'écorce et des arilles de grenade, testée par la méthode quantitative de la capacité antioxydante totale. Cette activité est exprimée en nombre d'équivalents d'acide ascorbique (EAA), a été obtenue à partir de la courbe d'étalonnage. Le pouvoir réducteur des différents extraits phénoliques de grenade était compris entre $(9.137 \pm 1.527$ et 67.450 ± 0.362 mg Équivalent acide ascorbique/g d'extrait sec) pour l'extrait phénolique de l'écorce, et entre $(1.740 \pm 0.973$ et 34.810 ± 2.669 mg /g d'extrait sec) pour ce qui est des arilles. L'activité antioxydante totale s'est avérée plus élevée dans l'extrait phénolique de l'écorce ($67,45 \pm 0.36$ mg EAA/g d'extrait sec) à une concentration de 0.6 mg/ml en comparaison avec celle des arilles à la même concentration (34.81 ± 2.66 mg EAA/g d'extrait sec) (**Figure 40**). Les résultats ont indiqué une capacité antioxydante totale dose-dépendante.

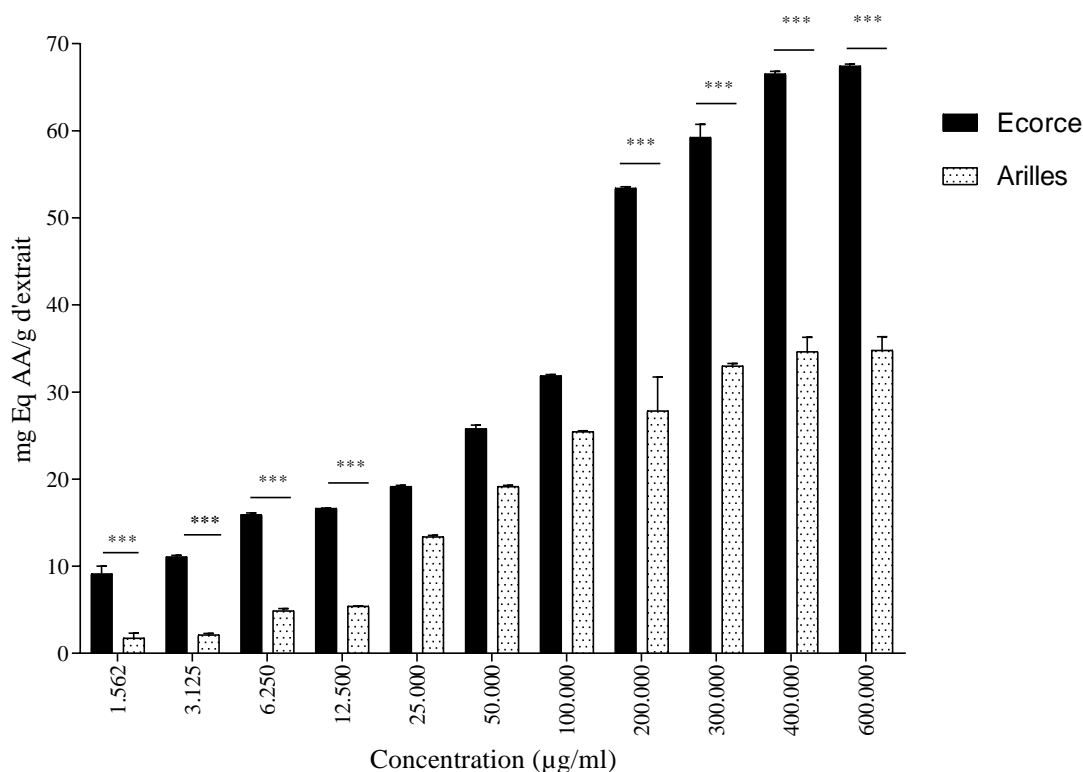


Figure 40: Activité antioxydante totale des extraits phénoliques de la grenade.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0.001$ indique une différence significative entre les deux groupes (écorce et arilles).

2.7.5 Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Pour mieux évaluer l'effet antioxydant des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles du grenadier, et à côté de leur pouvoir antioxydant par le piégeage des radicaux libres, et leur capacité de réduire le Mo (VI) en Mo (V); le pouvoir réducteur des extraits de la plante par la méthode de FRAP à été évalué. Cette technique permet de mesurer la réduction du Fe^{3+} (fer ferrique) en Fe^{2+} (fer ferreux) en présence d'un antioxydant.

La **Figure 41** et la **Figure 43**, montrent la cinétique de la réduction du (TPTZ- Fe^{3+}) en (TPTZ- Fe^{2+}) par les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade. L'absorbance continue à augmenter après 5 minutes de réaction et même doublée à 30 minutes pour les concentrations les plus élevées. En revanche, la réaction de l'acide ascorbique est presque stable en fonction du temps sans changement apparent dans l'absorbance après les premières cinq minutes sauf pour la concentration maximale (4.9 µg/ml) (**Figure 42**).

L'augmentation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP correspond à une grande capacité de réduction du (Fe^{3+}). Cela se traduit par l'augmentation de l'absorbance à 700 nm. Les **Figures 41** et **43** indiquent clairement que le pouvoir réducteur sur le fer ferrique (Fe^{3+})

en fer ferreux (Fe^{2+}) varie linéairement avec la variation de la concentration en extrait. Cela est en accord avec les résultats de méthodes précédentes. A partir des résultats obtenus, nous avons remarqué une augmentation concentration-dépendante de l'activité de l'extrait phénolique d'écorce comparée à celle de l'extrait phénolique des arilles.

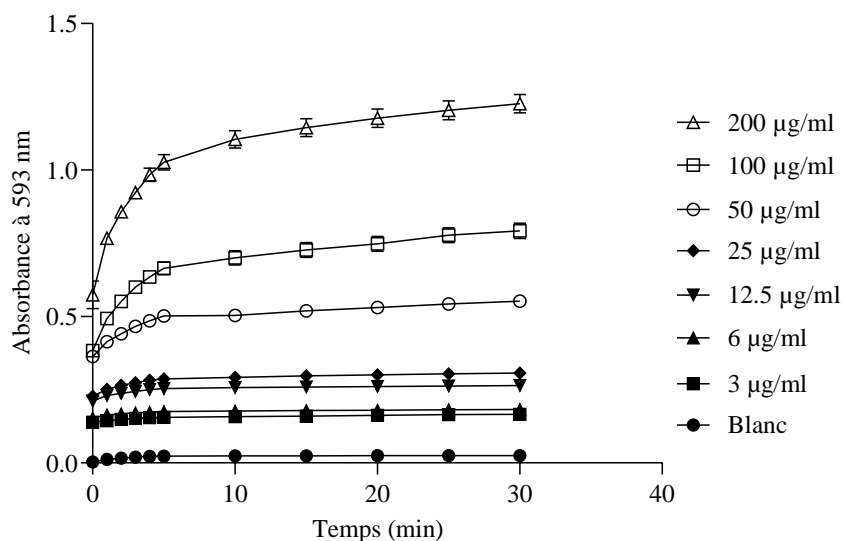


Figure 41: Cinétique de la réduction du TPTZ- Fe^{3+} en TPTZ- Fe^{2+} par les extraits de l'écorce.

Chaque valeur présente la moyenne \pm sem d'au minimum trois essais ($n=3$).

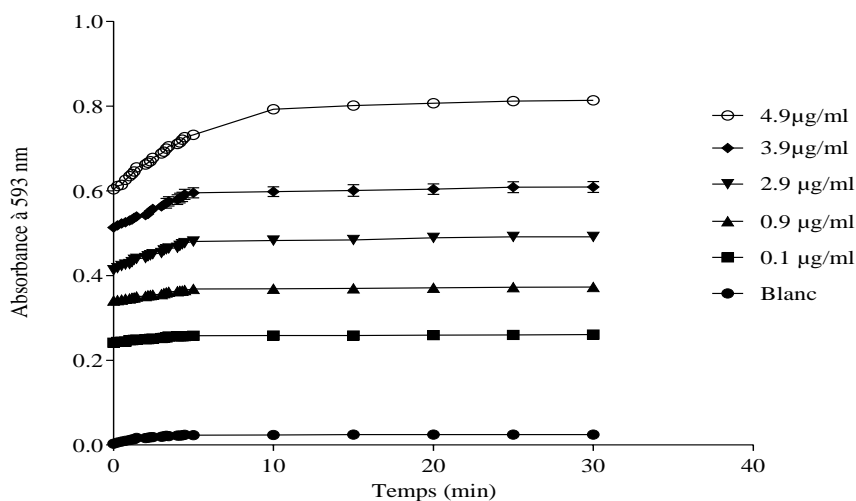


Figure 42: Cinétique de la réduction du TPTZ- Fe^{3+} en TPTZ- Fe^{2+} par l'acide ascorbique.

Chaque valeur présente la moyenne \pm sem d'au minimum trois essais ($n=3$).

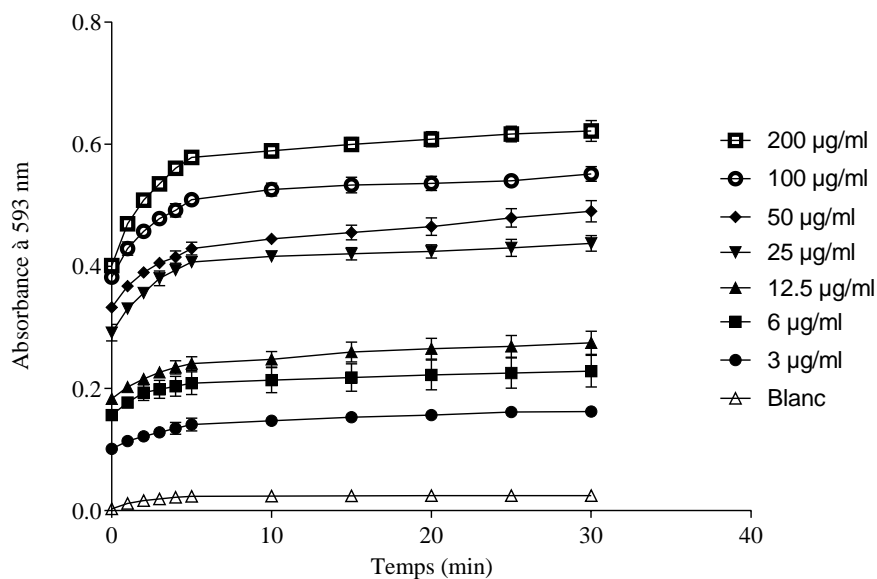


Figure 43: Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par l'extrait des arilles.

Chaque valeur présente la moyenne \pm sem d'au minimum trois essais (n=3).

Les **Figure 44** et **45**, montrent le pouvoir réducteur des extraits phénoliques issus d'arilles et d'écorce de *Punica granatum* (Sefri) à différentes concentrations comparées à celui de l'acide ascorbique après 5 min et 30 min d'incubation.

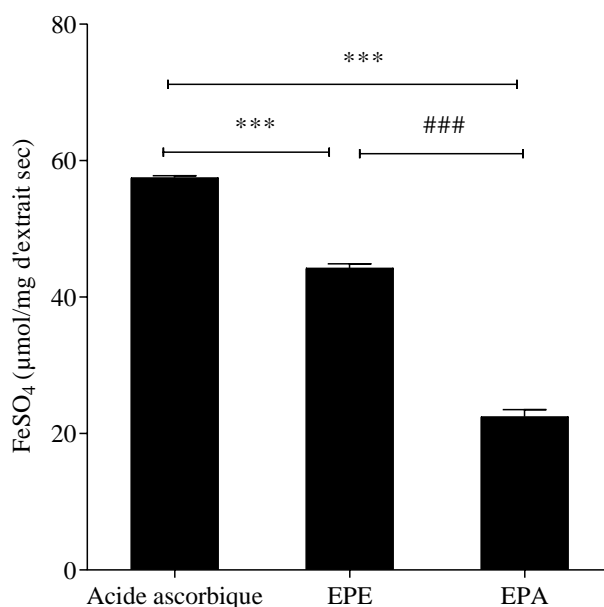


Figure 44: Pouvoir réducteur des extraits de *Punica granatum* L. testé par la méthode de FRAP (après 5 min).

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significative par rapport au contrôle positif (acide ascorbique). ### $p < 0,001$ indique une différence significative entre EPE et EPA.

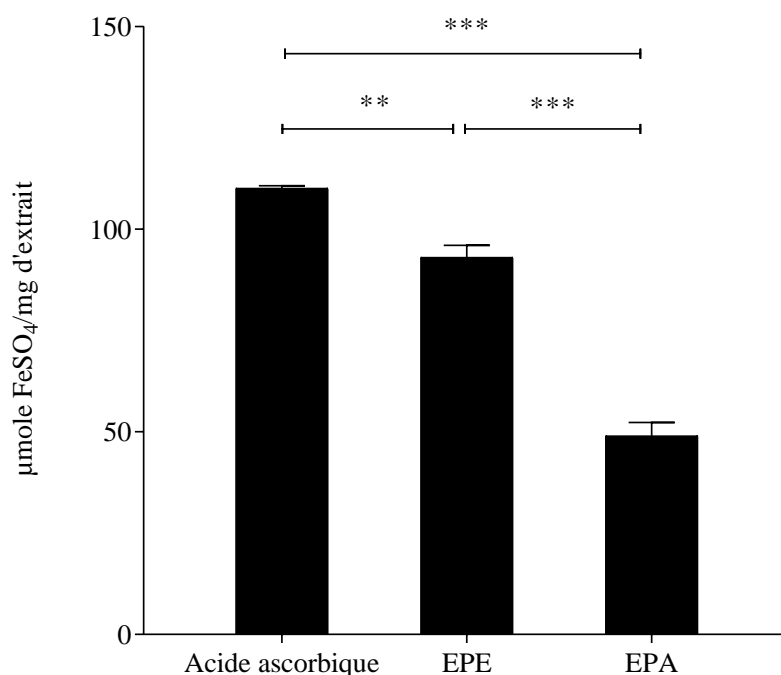


Figure 45: Pouvoir réducteur des extraits de *Punica granatum* L. testé par la méthode de FRAP (après 30 min).

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. ** $p < 0,01$, et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle positif (acide ascorbique). ### $p < 0,001$ indique une différence significative entre EPE et EPA.

Les résultats des **Figures (44 et 45)**, montrent que l'extrait phénolique d'écorce possède un pouvoir réducteur significativement supérieur par rapport à celui des arilles.

Le paramètre EC1 (concentration de l'antioxydant ayant un pouvoir réducteur du TPTZ équivalent à celui de 1 mM du FeSO₄), proposé par Pulido *et al.* (Pulido et al., 2000) a été calculé pour les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade et l'acide ascorbique à 5 et à 30 minutes (**Tableau 18**). L'EC1 est inversement proportionnel au pouvoir réducteur. Le pouvoir réducteur est également exprimé en micromoles d'équivalents du FeSO₄ par milligramme d'extrait ou de standard (µmole d'équivalents FeSO₄/mg extrait) (**Tableau 18**). Le tableau ci-dessous rapporte les valeurs de la CE1 et le pouvoir réducteur des différents extraits étudiés du fruit de *Punica granatum* L.

Tableau 18: Les valeurs de l'EC1 des extraits de grenade et de l'acide ascorbique

Extraits	EC1 (µg/ml)		Pouvoir réducteur (µmole FeSO ₄ /mg d'extrait sec)	
	5 min	30 min	5 min	30 min
Écorce	1.93 ± 0.09***	1.61 ± 0.07***	44.263 ± 1.046***	93.082 ± 5.144**
Arilles	2.873 ± 0.01***	2.944 ± 0.02***	22.486 ± 1.772***	48.922 ± 5.809***
Acide ascorbique	1.261 ± 0.008	1.126 ± 0.01	47.495 ± 0.524	110.131 ± 1.093

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon ** $p < 0.01$, et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle positif (acide ascorbique).

Les résultats d'EC1 et du pouvoir réducteur des extraits phénoliques de grenade (Tableau 18 et Figure 46), montre que l'acide ascorbique est le plus active suivi par l'extrait de l'écorce. Les extraits des arilles présentent une faible activité en comparant avec les autres échantillons.

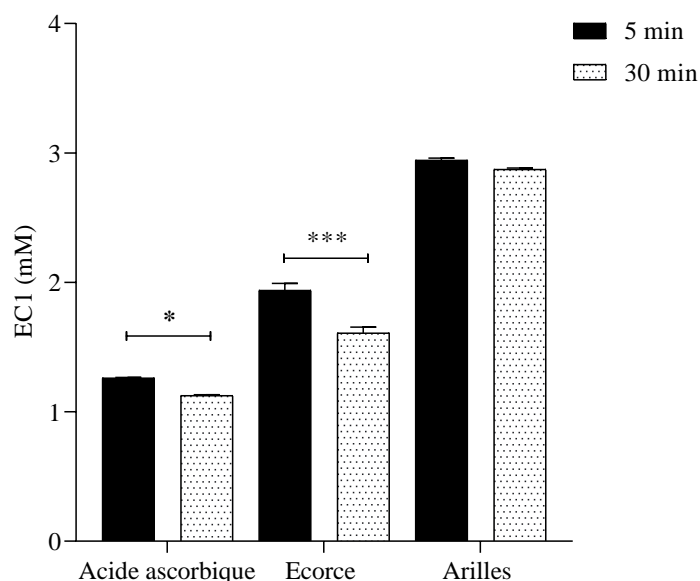


Figure 46: Les valeurs de l'EC1 des extraits de *Punica granatum* et de l'acide ascorbique testé par la méthode de FRAP (après 5 et 30 min).

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon * $p < 0.05$ et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives entre les groupes (écorce et arilles).

2.7.6 Décoloration du β -carotène

Le mécanisme de blanchiment de β -carotène est un phénomène à médiation des radicaux libres résultant d'hydroperoxydes formés à partir de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène, en entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et/ou inhibé l'oxydation et donc prévenir le blanchissement du β -carotène. La **Figure 47**, représente l'activité antioxydante testée par la méthode de décoloration du β -carotène des différents extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de fruit de *Punica granatum* en comparaison avec le BHT (Standard de référence).

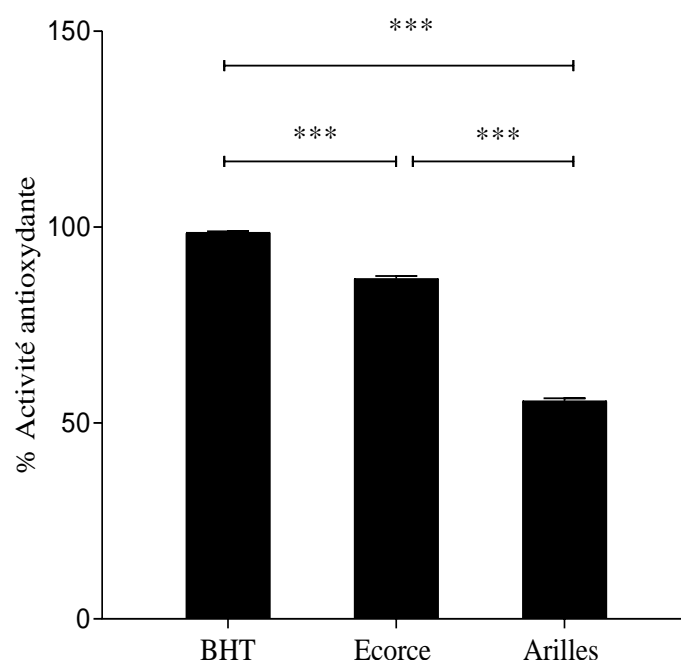


Figure 47: Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du grenadier testé par la méthode de la décoloration du β -carotène à une concentration de 1 mg/ml après 24 h.

*Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significatives par rapport au contrôle positif (BHT).*

Nous constatons que les extraits phénoliques de la grenade ont présenté des réponses différentes vis-à-vis de la décoloration du β -carotène. La plus importante activité antioxydante a été exercée par l'extrait phénolique de l'écorce avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de (86.83%) comparé à celui des arilles (55.64%).

2.7.7 Méthode de thiocyanate ferrique (FTC)

La peroxydation lipidique dans un système biologique soumis à un stress oxydatif produit des hydroperoxydes lipidiques, qui se transforment ensuite en radicaux alkoxyde lipidique (LO^\cdot) ou peroxyde lipidique (LOO^\cdot). Ces radicaux sont impliqués dans de nombreux dommages cellulaires, induisant des maladies dégénératives. Les hydroperoxydes lipidiques sont stables à température ambiante, mais ils sont décomposés en radicaux par la chaleur, la lumière UV ou les métaux de transition. L'activité antioxydante des extraits phénoliques de grenade « Sefri » a été déterminée en se basant sur la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode du thiocyanate à 37°C après l'addition de 200 µg/ml d'échantillon d'extrait. Au cours de la peroxydation des lipides, des peroxydes sont générés qui oxydent le fer ferrique (Fe^{2+}) en fer ferreux (Fe^{3+}) lors de l'ajout de $FeCl_2$. L'addition de thiocyanate d'ammonium (SCN^-) donne un complexe de thiocyanate ferrique avec une absorbance maximale à 500 nm. L'effet antioxydant des extraits de grenade dans la prévention de la peroxydation de l'acide linoléique mesuré par la méthode du thiocyanate ferrique, est représenté dans la **Figure 48**.

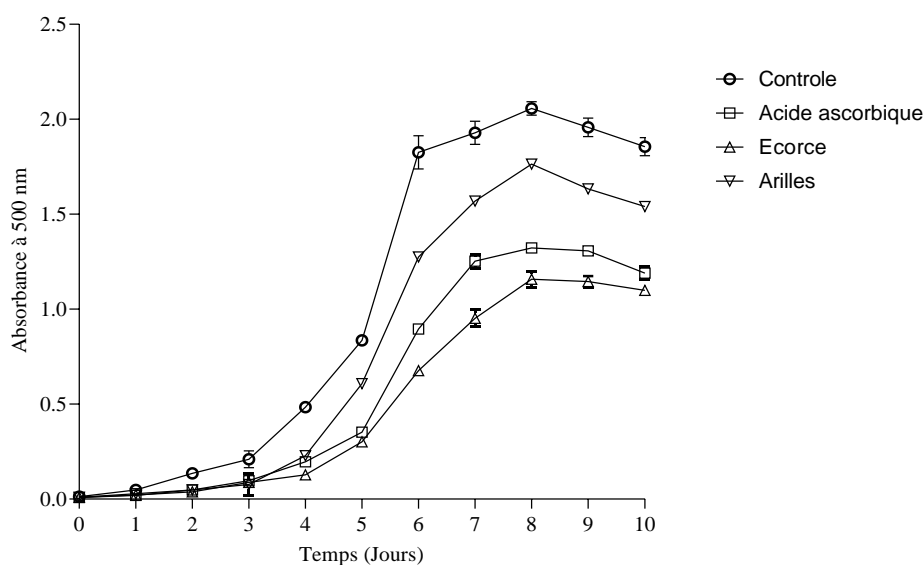


Figure 48: Cinétique des absorbances des différents extraits phénoliques du grenadier et de l'acide ascorbique évaluée par la méthode de thiocyanate ferrique (FTC) à différents intervalles de temps.

Dans notre étude, la peroxydation lipidique était élevée jusqu'à 8 jours (la densité optique du contrôle était maximale à 8 jours). Le contrôle positif et les extraits phénoliques de grenade avaient des valeurs d'absorbances croissantes atteignant un maximum à 8 jours et ces valeurs diminuent au 9 et 10^{ème} jour.

Comme le montre la **Figure 48**, l'absorbance de l'extrait phénolique de l'écorce à 9 et 10 jours ($1,146 \pm 0,029$ et $1,098 \pm 0,001$, respectivement) a diminué de manière importante par rapport à l'absorbance de l'extrait phénolique des arilles aux 9^{ème} et 10^{ème} jours ($1,633 \pm 0,008$ et $1,540 \pm 0,00$, respectivement). L'absorbance de l'extrait phénolique de l'écorce aux 9^{ème} et 10^{ème} jours était inférieure à l'absorbance de l'acide ascorbique ($1,307 \pm 0,013$ et $1,190 \pm 0,035$, respectivement). En revanche, l'extrait phénolique des arilles avait une absorbance plus élevée aux 9^{ème} et 10^{ème} jours par rapport au contrôle (acide ascorbique). Le témoin a présenté la valeur la plus élevée tout au long de l'étude. Les valeurs d'absorbance pour tous les échantillons étaient maximales à 8 jours et ont ensuite chuté à 9 et 10 jours en raison des composés de malondialdéhyde (MDA) provenant de l'oxydation de l'acide linoléique, dans lequel le peroxyde réagit avec le chlorure ferreux pour former un pigment rougeâtre de chlorure ferrique.

Le pourcentage d'inhibition de l'extrait phénolique de l'écorce de grenade « Sefri » à 7 et 8 jours ($35,66 \pm 3,744$ % et $23,23 \pm 4,743$ %, respectivement) était plus élevé que celui de l'extrait phénolique des arilles ($20,65 \pm 0,070$ et $16,54 \pm 1,216$ %, respectivement). De même, le pourcentage d'inhibition de l'extrait phénolique de l'écorce à 7 et 8 jours était supérieur au pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique ($33,58 \pm 3,716$ et $20,87 \pm 1,297$ %, respectivement). L'extrait des arilles avait un pourcentage d'inhibition plus faible à 7 et 8 jours par rapport à la vitamine C (**Figure 49**).

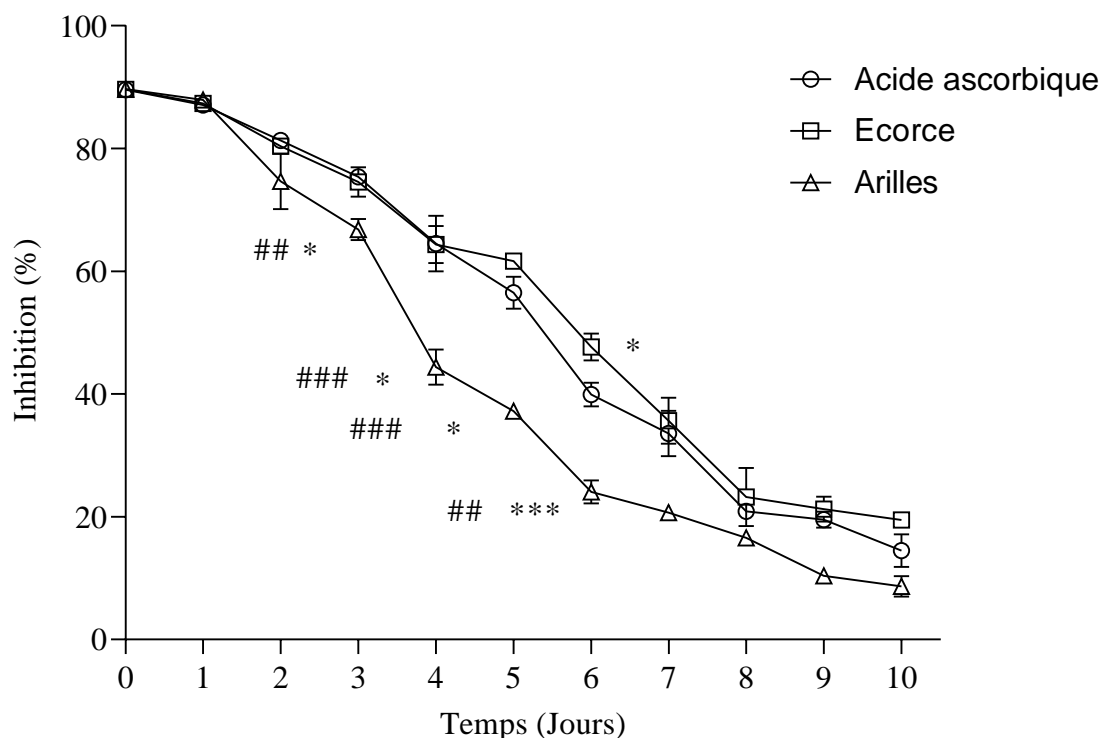


Figure 49: Activité antioxydante des différents extraits phénoliques du grenadier et de l'acide ascorbique évaluée par la méthode de thiocyanate ferrique (FTC) à différents intervalles de temps.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle positif. ## $p < 0,01$ et ### $p < 0,001$ indiquent des différences significatives entre les deux extraits phénoliques (écorce et arilles).

2.7.8 Méthode de l'acide thiobarbiturique (TBA)

Le **Tableau 19** montre le pourcentage d'inhibition de tous les échantillons. Les pourcentages d'inhibition de l'extrait phénolique des arilles étaient significativement ($P < 0,001$) inférieurs à ceux de l'extrait phénolique d'écorce et ceux de l'acide ascorbique. Cependant, les pourcentages d'inhibition étaient significativement ($P < 0,001$) plus élevés dans l'extrait phénolique de l'écorce que dans l'acide ascorbique (**Figure 50**). Les résultats de la méthode de l'acide thiobarbiturique (TBA) étaient en accord avec ceux de la méthode du thiocyanate ferrique (FTC).

Tableau 19: Activité antioxydante des extraits de grenade par la méthode de l'acide thiobarbiturique

Échantillons	Inhibition (%)
Contrôle	0
Acide ascorbique	38.10 ± 0.916
Écorce	56.40 ± 3.428***
Ariles	19.89 ± 0.597***

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significatives par rapport au contrôle positif (acide ascorbique).

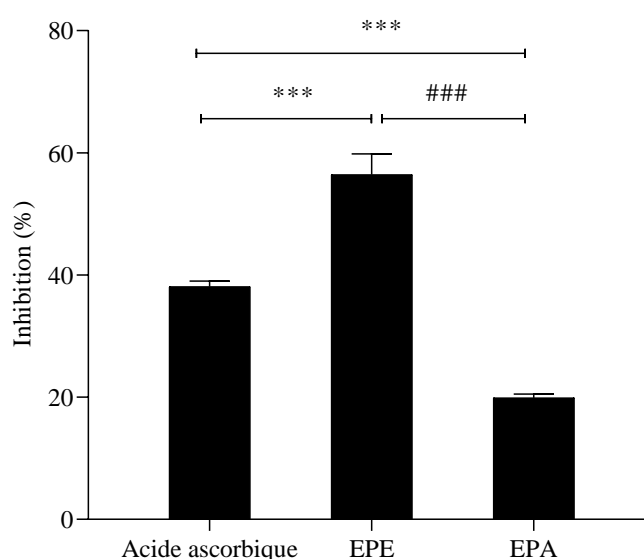


Figure 50: Activité antioxydante des différents extraits phénoliques du grenadier et de l'acide ascorbique évaluée par la méthode de l'acide thiobarbiturique (TBA).

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon. *** $p < 0,001$ indique une différence significatives par rapport au contrôle positif (acide ascorbique). ### $p < 0.001$ indique une différence significative entre EPE et EPA.

2.7.9 Test de peroxydation lipidique (TBARS)

La peroxydation lipidique est un processus au cours duquel les oxydants (les radicaux libres) attaquent les lipides contenant des acides gras insaturés et génèrent des radicaux peroxydes lipidiques et des hydroperoxydes (Mas-Bargues et al., 2021). La ou les couches lipidiques de la membrane cellulaire sont essentielles au maintien de la perméabilité cellulaire et de l'homéostasie physiologique, mais elles sont également vulnérables à la peroxydation lipidique qui, si elle n'est pas contrôlée, peut entraîner la mort cellulaire et des lésions tissulaires (Mas-Bargues et al., 2021; Su et al., 2019). Les TBARS (substances réactives à

l'acide thiobarbiturique) sont des coproduits formés au cours de la peroxydation des acides gras insaturés (acides gras de la série omega 3 et acides gras polyinsaturés de la série omega 6) (Hodges et al., 1999). Leur détermination permet de quantifier l'état d'oxydation des échantillons. La détermination des TBARS s'effectue à partir de courbes étalon qui sont déterminées par mesure de l'absorbance d'une solution de concentration connue de TEP (1, 1, 3,3 tetramethoxytetraethoxypropane). La valeur de l'absorbance de l'échantillon est reportée sur la courbe étalon pour déterminer la concentration en malondialdéhyde (MDA). Les résultats sont exprimés en nmol/ml de MDA.

Dans cette expérience, nous avons évalué les effets inhibiteurs des extraits phénoliques de grenade sur la peroxydation lipidique induite par des produits chimiques (CuSO_4) dans un plasma riche en lipide (**Figure 51**).

Tous les extraits phénoliques de grenade (l'écorce et les arilles), ont réduit de manière similaire et dose-dépendante ($p < 0.01$) la peroxydation lipidique (**Figure 51**). L'effet inhibiteur le plus fort a été observé à 0.2 mg/ml pour tous les extraits. Il a été rapporté que les composés phénoliques naturels (exemple : les punicalagines) se comportent comme des antioxydants naturels à des concentrations élevées (Wu et al., 2019), ce qui peut expliquer l'augmentation de l'effet inhibiteur des extraits de grenade sur la peroxydation lipidique à 0.2 mg/ml dans notre étude (**Figure 51**).

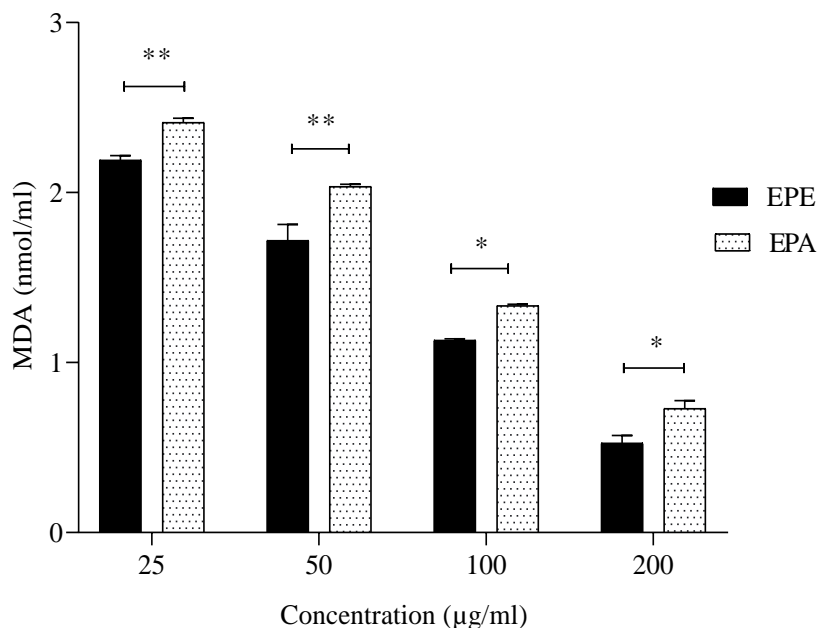


Figure 51: Activité antioxydante des différents extraits phénoliques du grenadier évaluée par la méthode de l'acide thiobarbiturique (TBARS) à différentes concentrations (25, 50, 100 et 200 µg/ml).

*Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± sem d'au moins trois essais indépendants de chaque échantillon à différentes concentration. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ indiquent des différences significatives entre les deux groupes (EPE et EPA).*

3 Discussion

Les plantes médicinales sont considérées actuellement comme une source inépuisable de composés actifs et de substances naturellement bioactives (Castronovo et al., 2021; Dehelean et al., 2021; Tanaka & Kashiwada, 2021). L'utilisation de ces molécules en phytothérapie ou en médecine traditionnelle, à connaît de nos jours un atout important. En outre, une telle thérapie à base de plantes médicinales, constitue un patrimoine médical précieux pour la santé humaine et son utilisation dans le traitement des maladies capable de prévenir l'apparition des effets secondaires indésirables observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une question de culture et de tradition au Maroc. Il faut noter que pour les besoins primaires de santé, une grande partie de la population marocaine a recours aux méthodes traditionnelles de médecine pour traiter ses maladies (Fatiha et al., 2017). L'incapacité de nombreux pays en cours de développement à fournir des médicaments pharmaceutiques contemporains, et le coût élevé de nombreux médicaments, ont contraint les communautés locales à rechercher des produits

alternatifs, tels que les plantes médicinales, dont l'efficacité et la sécurité ont été prouvées et qui sont culturellement acceptables (Chaachouay et al., 2019; Ullah et al., 2018).

La région du Béni Mellal-Khénifra est l'une des régions les plus diversifiées biologiquement, avec une biodiversité de première importance et de nombreuses plantes d'intérêt thérapeutique. Pour cette raison, cette région est la source de nombreuses plantes médicinales commercialisées dans tout le Maroc et à l'étranger, et l'utilisation des plantes en phytothérapie est encore très présente dans cette région. Parmi ces plantes, le grenadier (*Punica granatum* L.) et plus particulièrement la variété « Sefri » qui doit son nom à la couleur jaune de ses écorces. Cette plante jouit d'une notoriété nationale en raison des caractéristiques organoleptiques de ses fruits, typique à la région. Malgré ses bénéfices, les données sur la grenade « Sefri » de cette région sont rares et insuffisantes.

Le fruit du grenadier (*Punica granatum* L.) est l'un des fruits les plus populaires au Maroc. Les parties comestibles des grenades peuvent être consommées fraîches ou sous forme transformée (Khadivi & Arab, 2021). Il renferme des substances bioactives dans différentes parties possédant ainsi des effets bénéfiques pour la santé, à savoir les effets antioxydants, anticancéreux et anti-athérogènes (Adaramoye et al., 2017; Barati et al., 2020; Deng et al., 2017; Estrada-Luna et al., 2019; Kujawska et al., 2020; Liu et al., 2019). De nombreux chercheurs scientifiques à travers le monde ont étudié les composés phénoliques et l'activité antioxydante de l'écorce et des arilles de nombreuses variétés de grenade. Cette présente étude a été entreprise dans le but d'étudier les propriétés phytochimique et antioxydantes des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade extrait à partir d'une variété locale « Sefri ». Dans un premier temps, l'étude pomologique des fruits de grenade du cultivar étudié « Sefri », a révélé que le poids moyen des fruits était de l'ordre de 473 g. Cette valeur est supérieure à celle rapportés par Adiba et al (Adiba et al., 2021), qui ont trouvé que le poids moyen de la grenade « Sefri » était entre 281.49 et 440.60 g. De plus, nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Ismail et al. pour des cultivars égyptiens (entre 277 et 280 g) (Ismail et al., 2014), à ceux trouvés par Escarcega et al. (entre 285.53 et 374.73 g) pour des variétés Allemande (Escarcega et al., 2020), à ceux rapporté par Mekni et ses collaborateurs (Mekni et al., 2019), dont le poids moyen du fruit du grenadier tunisien était entre 224.63 et 356.28 g ; et finalement à ceux révélé par Khadivi et al. (entre 103.28 et 407.59 g) pour des cultivars iraniens (Khadivi & Arab, 2021). En revanche, nos résultats était inférieur à ceux rapporté par Hmid et ses collaborateurs avec un poids moyen de l'ordre de 506.66 g pour la variété Sefri (Hmid et al., 2018). De plus, Loukhmas et al. (Loukhmas et al., 2021) ont révélé

un poids moyen élevé (523.18 g) par rapport à nos résultats pour la même variété. La valeur la plus élevée pour la variété Sefri était rapporté par Martinez et al. et Legua et al. avec un poids moyen de l'ordre de 535 g (Legua et al., 2012; Martínez et al., 2012).

Nos résultats sont dans la même gamme de variation du poids moyen de la grenade, présentés par plusieurs auteurs : entre 101.3 et 549.7 g pour des cultivars tunisiens (Zaouay et al., 2012), entre 206.60 et 466.00 g (Hmid et al., 2018), entre 246.90 et 589.57g (Loukhamas et al., 2021) et entre 435.4 et 504.1 g (Martínez et al., 2012) pour des cultivars marocains ; entre 189.4 et 595.9 g pour des cultivars croates (Radunić et al., 2015), entre 128.4 et 472.4 g pour des cultivars mexicains (Tapia-Campos et al., 2021), entre 106.60 et 496.91 g pour des cultivars iraniens (Khadivi et al., 2018), entre 267 et 497 g pour des variétés espagnoles (Alcaraz-Mármol et al., 2017), entre 69.9 et 795.3 g pour des variétés turques (Caliskan & Bayazit, 2013), et finalement entre 210.5 et 576.5 g pour des variétés chinoises (Peng et al., 2020). La grandeur des écarts types observés peuvent être liés à plusieurs facteurs édaphiques, géographiques, écologiques, et hydriques (Khadivi & Arab, 2021). Ce fait suggère que le poids des fruits pendant la maturité dépend du cultivar et fournit des informations précieuses pour les agriculteurs et les transformateurs (Nuncio-Jáuregui et al., 2015). Dans des travaux antérieurs menés par Zarei et al. (Zarei et al., 2011), le poids moyen des fruits augmente progressivement aux cours des trois différents stades de maturation (76.71, 150.32 et 235.09 g), pour 20, 80 et 140 jours, respectivement. Ce qui est en accord avec nos résultats, car pour la réalisation de cette étude nous avons récolté les fruits au troisième stade de maturation.

Les arilles sont la partie comestible des fruits de grenade, contenant le jus, la pulpe et les pépins. Ainsi, le fait de connaître ses caractéristiques permet aux producteurs et aux transformateurs de mieux promouvoir ce fruit. Les arilles ont une valeur économique et sont donc les traits les plus importants ciblés par les cultivateurs et l'industrie alimentaire (Meziane et al., 2016). Pour le même cultivar, Adiba et al. (Adiba et al., 2021) ont trouvé une valeur de 339.50 g. Ces résultats sont supérieurs à ceux rapporté par Loukhamas et al. (Loukhamas et al., 2021) avec un poids moyen de l'ordre de 291.60 g. De plus, pour les variétés de Turquie, le poids d'arilles par rapport au fruit varie de 118 à 335g (Durgaç et al., 2008), tandis que celles d'Oman, le poids moyen des arilles était plus élevé variant de 500 à 651 g (Al-Said et al., 2009). Par ailleurs, ces résultats sont supérieurs à ceux obtenu dans notre étude avec un poids moyen de l'ordre de 250.02 g. En revanche, nos résultats étaient supérieurs à ceux révélé par Khadivi et al. (Khadivi & Arab, 2021) et à ceux rapporté par Ghadge et Jadhav avec un poids moyen des arilles entre 51.55 et 238.97 g pour des variétés

iraniens et entre 164.50 et 169.15 g pour des cultivars indiens, respectivement (Ghadge & Jadhav, 2015).

En outre, le rendement en arilles est une propriété souhaitable du point de vue du consommateur ainsi que pour le traitement industriel des jus (Valero & Ruiz-altisent, 2000). Nos résultats ont montré un rendement en arilles de l'ordre de 52.82 %. Ces résultats restent dans le même ordre de grandeur que ceux apportés par la littérature. En effet, l'équipe d'Adiba ont rapporté que le rendement en arilles était compris entre 47.27 et 55.64 % pour la variété « Sefri ». Par contre, Hmid et al. (Hmid et al., 2018) ont rapporté un taux supérieur par rapport à nos résultats (entre 61.52 et 67.57 %) pour la même variété. Il est à noter que certaines variations relatives au (%) peuvent être observées quand il s'agit de variétés différentes. C'est le cas des cultivars iraniens (57.86 à 75.48%) (Akbarpour et al., 2009) et de l'Afrique du Sud (53.4 à 61.2 %) (Fawole & Opara, 2013). En termes de rendement de jus, nos résultats ont montré un taux de l'ordre de 33.24 % qui est inférieur à celui rapporté par Adiba et al. qui était compris entre 50.02 et 54.96 % (Adiba et al., 2021) ; et celui trouvé par Mphahlele et al. pour la variété du « Wonderful » et qui était de l'ordre de 51.86% (Mphahlele et al., 2016). Nos résultats restent dans la même gamme trouvée pour la variété Sefri : entre 32.85 et 45.97% (Hmid et al., 2018), entre 29.32 et 47.29 % pour les variétés mexicaines (Tapia-Campos et al., 2021), et entre 26.95 et 46.55 % pour des variétés iraniennes (Tehranifar et al., 2010). Pour le pourcentage en pépins, dans notre étude était de l'ordre de 12.53 %, alors que dans l'étude menée par Hmid et al. (Hmid et al., 2018) était moins faible (11.26 %) pour le même cultivar. Une autre caractéristique telle que le poids moyen des écorces a été enregistrée. Le poids moyen des écorces dans notre étude était de l'ordre de 168.78 g. Cette valeur est inférieure à celle trouvée par Hmid et al. (Hmid et al., 2018) qui était de l'ordre de 190.02 g, mais elle est plus élevée par rapport aux valeurs trouvées pour les cultivars algériens, 46.19 g pour le Doux de Messaad trouvée par Meziane et al. (Meziane et al., 2016), et celles trouvées par Ismail et al. (Ismail et al., 2014) (30.12 - 51.46 g) pour les cultivars égyptiens. De plus cette valeur reste supérieure à celle trouvée pour les cultivars tunisiens (109.54 g) rapportée par Mansour et al. (Mansour et al., 2011). Nos résultats restent dans le même intervalle de variation du poids moyen de l'écorce de la grenade présentés par Tapia-Campos et al. qui était compris entre 45.53 et 288.52 g pour des variétés mexicaines (Tapia-Campos et al., 2021).

Les rendements des extraits méthanoliques obtenus dans les fruits de la grenade « Sefri » étaient de l'ordre de 32.25% et 14.20% dans la peau et les graines, respectivement. Ces

données sont comparables aux valeurs trouvées par Sabraoui et ses collaborateurs (Sabraoui et al., 2020) dans l'écorce et les arilles de la grenade « Sefri » en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction (36 % et 16%, respectivement). En revanche, El Moujahed et ses collaborateurs (El moujahed et al., 2021) ont révélé un pourcentage plus élevé pour l'extrait méthanolique et aqueux de la grenade « Sefri » avec un pourcentage de l'ordre de 36.40% et 59.85%, respectivement. De plus, Pagliarulo et al. (Pagliarulo et al., 2016) ont rapporté un pourcentage plus élevé (49.9%) dans la peau en utilisant 50% d'éthanol/eau (v/v). Nos résultats sont supérieurs aux données rapportées par Singh et al. (Singh et al., 2002) en utilisant le méthanol comme solvant : 9.38% et 8.62% dans la peau et les graines, respectivement ; par Magangana et al. (Magangana et al., 2021) avec un taux compris entre 26.8 et 29.5% pour l'extrait éthanolique (70%, v/v) de l'écorce de la grenade (variété Wonderful) ; et par Singh et al. (Singh et al., 2014) avec un pourcentage de l'ordre de 13.22% pour l'extrait aqueux des arilles. Les études ont montré que le méthanol était le solvant permettant d'obtenir un rendement maximal de l'extrait et un contenu phénolique maximal des différentes parties du fruit de grenade (Lampakis et al., 2021). Les différences de rendement pourraient être liées à la taille des particules de l'échantillon (Sabraoui et al., 2020). Une étude de Wang et al. (Wang et al., 2011) suggère que des particules d'échantillon plus petites augmentent le taux d'extraction.

En 2014, Singh et al. (Singh et al., 2014) ont trouvés que l'extraction sélective d'antioxydants provenant de sources naturelles par un solvant approprié est très importante dans l'obtention d'extraits à forte activité antioxydante. Ils ont extrait les antioxydants à partir de la peau et de la pulpe du fruit de grenadier en utilisant le méthanol, l'acétone et l'eau. Ils ont constaté que le méthanol a donné le meilleur rendement. Selon Wang et al. (Wang et al., 2011), les antioxydants à base de plantes sont extraits des matières premières ou des déchets de l'industrie alimentaire par les solvants organiques tels que le méthanol, l'acétone et l'éther diéthylique. Ils rajoutent aussi que le méthanol est un extracteur efficace pour une large gamme de polyphénols, et fréquemment utilisé à l'échelle de laboratoire et à l'échelle industrielle, sachant qu'il est facilement accessible et est bon marché.

D'autre part, Sultana et al. (Sultana et al., 2008) ont déclaré un rendement de 29.9 % pour les écorces de grenade, 24.6% pour la peau de banane, 21.5% pour les écorces d'agrumes et 16.4% pour la peau de pomme extraits avec 80% de méthanol. Le méthanol est généralement recommandé pour être un meilleur solvant pour l'extraction de composés antioxydants en raison de la polarité et de la disponibilité. L'efficacité et la capacité du méthanol peuvent

augmenter en utilisant de l'eau comme co-solvant, en particulier lorsque l'extraction d'antioxydants de différents types est nécessaire (Iqbal et al., 2005). En générale, les composés phénoliques dans les plantes sont des composés polaires, qui sont souvent extrait avec des solvants polaires tels que l'hydro-acétone et le méthanol. Les profils phénoliques diffèrent également selon la nature des solvants utilisés (Kylli, 2011). Dans ce même contexte, Li et al. (Li et al., 2006) considèrent qu'une combinaison de différents solvants peut être plus efficace pour extraire les antioxydants car ces derniers peuvent différer par leur solubilité dans les différents solvants.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines, les stéroïdes et tritérpénoïdes, les carbohydrates et les glycosides. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par El Moujahed et ses collaborateurs (El moujahed et al., 2021) qui ont révélé la présence des tanins, des flavonoïdes, des stéroïdes, des saponines, et des coumarines dans l'extrait méthanolique de l'écorce de la grenade « Sefri » ; et avec ceux rapporté par Eddebbagh et al. (Eddebbagh et al., 2016) qui ont trouvé que l'écorce, les feuilles et les fleurs de la grenade marocaine sont riches en polyphénols, flavonoïdes et alcaloïdes. De plus, Elaleem et ses collaborateurs (Elaleem et al., 2016) ont révélé la présence de tritérpénoïdes, de stéroïdes, de flavonoïdes, de tanins, d'alcaloïdes , de glycosides et de saponines dans les extraits phénoliques de l'écorce de fruit de *P. granatum*. Farag et al. ont révélé aussi la présence de ces composés phytochimiques dans l'écorce et les feuilles de la grenade pour la variété de Wonderful (Farag et al., 2020). Des résultats similaires ont été également rapportés par Sharma et Es (Sharma & Es, 2018), Hasan et al. (Hasan et al., 2018), Belkacem et al. (Belkacem et al., 2014); Chaitra et al. (Chaitra et al., 2012); Moorthy et al. (Moorthy et al., 2013); Khaleel et al. (Khaleel et al., 2016); Sajjad et al. (Sajjad et al., 2015); Deore et al. (Deore et al., 2016); et Kesur et al. (Kesur et al., 2016).

D'après les analyses phytochimiques effectuées par Redha et ses collaborateurs (Redha et al., 2018), l'écorce et l'arille de grenade contient des phénols et des tanins, des flavonoïdes, des quionones, des coumarines, des stéroïdes, des triterpénoïdes et des alcaloïdes. Ils ont constaté aussi que les anthocyanes n'étaient présents que dans les arilles (Redha et al., 2018). Bhandary et al. ont révélé l'absence des saponines et des alcaloïdes dans l'extrait éthanolique de l'écorce en comparaison avec l'extrait éthanolique des arilles (Bhandary et al., 2012). De plus, Mahmood et ses collaborateurs ont montré que l'extrait éthanolique de l'écorce ne contient pas les flavonoïdes et les alcaloïdes (Mahmood et al., 2019). En revanche, Marsoul et

al. (2020) ont révélé la présence des polyphénols et des flavonoïdes mais pas des alcaloïdes dans l'extrait méthanolique de l'écorce (Marsoul et al., 2020). Mêmes résultats était enregistré par Chebaibi et Filali, qui ont montré que l'extrait aqueux de l'écorce de la grenade marocaine ne contient pas des alcaloïdes (Chebaibi & Filali, 2013).

La grenade est connue pour être l'un des fruits les plus riches en composés phénoliques (Esposito et al., 2021; Giménez-Bastida et al., 2021), en particulier l'écorce qui contient des quantités plus élevées de polyphénols, tels que les acides puniques, les acides galliques, ellagiques et les anthocyanes (Magangana et al., 2020). Des études ont également rapporté que le contenu phénolique des écorces de grenade était 10 fois plus élevé (249.4 mg/g) que celui trouvé dans la pulpe (24.4 mg/g) (Li et al., 2006). Également, Yu et al (2021) indiquent que les flavonoïdes et les tanins sont les composés les plus abondants dans l'écorce de cette plante (Yu et al., 2021). Par ailleurs, les travaux de recherche effectués par Ali en 2016, dans le but d'étudier l'influence du jus de fruit brut du grenadier en tant que produit riche en composés phytochimiques par rapport à d'autres jus de fruits (fraise et mangue) sur les caractéristiques du yaourt liquide, indiquent que l'analyse phytochimique du jus brut de *P. granatum* a mis en évidence la présence de plusieurs composés tels que les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les saponines, les glycosides, les tritérpénoïdes et stéroïdes et la vitamine C (Ali, 2016). Alors qu'ils ne sont pas présents dans le jus de fraise brut. Il note également l'absence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de glycosides et de saponines dans le jus de mangue brut. De plus, l'étude réalisée par Saleh et ses collaborateurs afin de déterminer les effets de la transformation (blanchiment, congélation et séchage) sur les composés bioactifs et les activités antioxydantes des sous-produits des fruits, a révélé que l'écorce de la grenade était le composés le plus riche en flavonoïdes et polyphénols en le comparant avec l'avocat (écorce et graines), kiwi, l'écorce de l'orange, et l'écorce de l'ananas (Saleh et al., 2021). Toutefois, la variation de la composition chimique de la grenade et de ses produits dépend largement du climat, du stade de maturité du fruit, du cultivar, du milieu de culture, des pratiques culturales et des systèmes de fabrication (Bar-ya et al., 2019; Coronado-reyes et al., 2021; Hasib et al., 2017; Tinebra et al., 2021; Topalovi & Mikulic-petkovsek, 2021).

L'analyse qualitative a été confirmée par une étude quantitative des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles du fruit de *Punica granatum* (variété Sefri), basée sur la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP), la Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP), le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux, des flavonols, des tanins condensés et hydrolysables, des proanthocyanidines et des anthocyanes.

La grenade est l'un des fruits les plus riches en composés phénoliques, à savoir la punicalagine, les anthocyanines et les acides gallique et ellagique et de la punicaline. Pourtant, il existe un manque d'informations sur le contenu phénolique de la peau et des graines de la grenade marocaine. Les analyses polyphénoliques par CLHP ont montré une teneur en punicalagine dans l'extrait phénolique de l'écorce supérieure de 100 à 300 fois de celle des arilles de la grenade « Sefri ».

Nous avons quantifié les isomères de punicalagine (α et β), l'acide ellagique et l'acide gallique par CLHP-UV et on a comparé les résultats avec des standards purs. Les résultats sont exprimés en mg/g d'extrait sec et montrent que la teneur en β -punicalagine était deux fois plus élevée que celle en α -punicalagine (302.38 mg/g contre 148.95 mg/g d'extrait sec, respectivement) pour l'extrait phénolique de l'écorce. Pour l'extrait des arilles, la concentration en α -punicalagine était plus élevée par rapport à celle de la β -punicalagine (entre 40.40 et 3.03 mg/g d'extrait sec, respectivement). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sabraoui et al. (Sabraoui et al., 2020), qui ont montré que la teneur en β -punicalagine était supérieur à celle de l' α -punicalagine pour l'extrait méthanolique de l'écorce de la grenade Sefri (200.21 et 130.66 mg/g d'extrait sec, respectivement). En revanche, l'extrait méthanolique des arilles contient une teneur plus faible en punicalagine (1.10 et 1.15 pour la β -punicalagine et l' α -punicalagine, respectivement) (Sabraoui et al., 2020). De plus, Aloqbi et ses collaborateurs ont montré que l'extrait méthanolique de l'écorce d'une variété espagnole de grenade était plus riche en punicalagine en le comparant avec le jus (Aloqbi et al., 2016). Les études sur la grenade ont établi que les composés phénoliques tels que la punicalagine, l'acide gallique et l'acide ellagique sont présents en grande quantité dans l'écorce de grenade, tandis que la concentration d'anthocyanes comme la delphinidine, la cyanidine et la pélargonidine est élevée dans le jus de grenade (Fischer et al., 2011; Gil et al., 2000; Qu et al., 2012). Cependant, ces concentrations élevées d'acide gallique, de punicalagine et d'acide ellagique ont été trouvées à la fois dans l'écorce de grenade et dans le jus commercial car la majorité des composés phénoliques ont été extraits pendant le processus de pressage (Fischer et al., 2011; Gil et al., 2000).

Les résultats de la composition minérale ont clairement montré que le sodium (Na) était le macroélément le plus abondant dans les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade Sefri, suivi du calcium (Ca) et du potassium (K). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux rapporté par Loukmas et al. (Loukmas et al., 2020) pour la variété Sefri dont l'iode (I) était le principal macroélément suivi du phosphore (P) et du soufre (S). En

revanche, Eksi et Ozhamamc (Ekşi & Özhamamcı, 2009), Alcaraz-Marmol et al. (Alcaraz-Mármol et al., 2017), Rowayshed et al. (Rowayshed et al., 2013), et Boussaa et al. (Boussaa et al., 2019) ont trouvé que le potassium (K) était le principal macroélément dans les fruits de grenade pour les cultivars turcs, espagnols, égyptiennes et tunisiennes (variété de Gebzi), respectivement. De plus, Omer et al. (Omer et al., 2019) et Sharma et al. (Sharma & Es, 2018) ont révélé que le calcium (Ca) et le phosphore (P) étaient les principaux macroéléments dans l'écorce, les graines et le fruit de grenade.

Le zinc (Zn), le fer (Fe) et le cuivre (Cu) étaient les principaux micro-éléments dans la grenade Sefri. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Omer et ses collaborateurs (Omer et al., 2019), et Boussaa et al. (Boussaa et al., 2019), dont le zinc (Zn) était le principal micro-élément dans l'écorce, le jus, les graines et le fruit de grenade. Cependant, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par Loukhamas et ses collaborateurs (Loukhamas et al., 2020) pour la même variété, ceux obtenus par Alcaraz-Marmol et al. (Alcaraz-Mármol et al., 2017) pour les cultivars espagnols, ceux de Rowayshed et al. (Rowayshed et al., 2013) pour des variétés égyptiennes, et ceux obtenus par Sharma et al. (Sharma & Es, 2018) pour des cultivars indiens dont le fer (Fe) et l'aluminium (Al) étaient les principaux micro-éléments dans l'écorce, les graines et le fruit de grenade.

La variété étudiée (Sefri) présentait des concentrations en minéraux plus élevées que les cultivars d'Arabie Saoudite (Al-Maiman & Ahmad, 2002), d'Espagne (Alcaraz-Mármol et al., 2017), de Turquie (Ekşi & Özhamamcı, 2009) et d'Egypte (Rowayshed et al., 2013), principalement en fer, zinc, magnésium, phosphore, soufre, et calcium. La variation de la concentration en minéraux de la grenade peut être due à des différences en fonction du cultivar, la nutrition de la plante, le climat et les conditions du sol (Alcaraz-Mármol et al., 2017).

Dans la présente étude, nous nous sommes principalement intéressés aux composés bioactifs de la grenade et à leurs propriétés biologiques liées à la phytochimie, en mettant l'accent sur les anthocyanes, les polyphénols, les flavonoïdes, et les tanins. Nos résultats ont montré que les niveaux de composés phénoliques diffèrent selon la partie de la grenade. L'extrait phénolique de l'écorce avait une teneur en composés phénoliques plus élevée que l'extrait des arilles (283.86 contre 166.9 mg EAG/g, respectivement). Nous avons également constaté que l'écorce était significativement plus riche en flavonoïdes totaux et en flavonols que les arilles (185.37 contre 57.43 mg EQ/g et 41.48 contre 12.74 mg EQ/g d'extrait sec, respectivement). Cependant, le contenu total en anthocyanes de l'écorce n'était pas

significativement plus riche que celui des arilles (102.97 contre 81.26 mg cyanidin-3-glu/100 g respectivement). Nos résultats ont également montré que les grenades contiennent des niveaux plus élevés de composés phénoliques et d'anthocyanidine, en particulier les extraits d'écorce et d'arille de la variété Sefri, par rapport aux variétés italienne, iranienne, turque, indienne et tunisienne (Singh et al., 2018). Russo et al. (Russo et al., 2018) ont rapporté que six anciennes variétés italiennes, ainsi que le cultivar international « Wonderful », tous les variétés de Gaeta, sont quantitativement les plus riches en termes de composés phénoliques dans l'écorce. Cependant, la variété marocaine Sefri contient encore plus de polyphénols (202.22 mg EAG/g contre 283.86 mg EAG/g Sefri). Derakhchan et al. (Derakhshan et al., 2018) ont également étudié la composition phénolique de l'écorce et ont rapporté que l'écorce de la variété Natanz a une teneur en composés phénolique plus faible que l'écorce de la variété Sefri (276.36 contre 283.86 mg EAG/g Sefri). De plus, la composition en flavonoïdes totaux et flavonols dans la variété Natanz était moins faible en comparaison avec nos résultats (36 mg rutine/g contre 185.37 mg EQ/g, et 25 mg rutine/g contre 41.48 mg EQ/g pour l'extrait d'écorce de la grenade Sefri) (Derakhshan et al., 2018). De plus, l'étude réalisée par Ghimire et al. (Ghimire et al., 2021) sur quatre variétés de grenade venant de l'Himalaya (Bedana, Ganesh, Kandhari, and Mridula) à montré que l'extrait aqueux de l'écorce était riche en composés phénoliques. La teneur la plus élevée en composés phénoliques a été trouvée pour la variété Ganesh (149.75 mg EAG/g) tandis que la plus faible a été trouvée pour la variété Kandhari (64.38 mg EAG/g) (Ghimire et al., 2021).

Tous ces résultats, y compris les nôtres, montrent que l'extrait d'écorce est plus riche en polyphénols que l'extrait d'arille. La teneur en anthocyanes totaux de nos échantillons était également plus élevée que celle rapportée dans d'autres études menées avec d'autres variétés de grenade (Oguzhan Caliskan & Bayazit, 2012; Tehranifar et al., 2010). Cependant, la différence dans la composition en polyphénols peut être influencée par des variations dans la composition phytochimique, le cultivar étudié, les méthodes d'extraction et les conditions expérimentales et environnementales.

Ainsi le dosage des tanins hydrolysables montre des teneurs relativement différentes pour les deux extraits d'écorces et des arilles de grenadier étudié (391.90 mg EAT/g pour l'extrait d'écorce; 107.75 mg EAT/g pour l'extrait des arilles). Ces teneurs sont importantes par rapport à celles trouvées par El Falleh et al. (Elfalleh et al., 2012), dans l'extrait méthanolique et aqueux d'écorce de grenade tunisienne (teneurs variées entre 139.63 et 62.71 mg EAT/g, respectivement), et celles trouvées par Çam et Hişil (Çam & Hişil, 2010) dans l'extrait

méthanolique et aqueux des écorces de grenade turque (260.2 mg EAT/g pour l'extrait méthanolique et 82.6 mg/g pour l'extrait aqueux). Nous constatons que l'extrait méthanolique d'écorce se caractérise par la teneur la plus importante (84.85 mg EC/g d'extrait sec) en tanins condensés et qui est plus importante que les teneurs rapportées par Saad et al. (Saad et al., 2012) (3.2 à 7.7 mg EC/g) ; Li et al. (Li et al., 2006) (10.9 mg EC/g d'extrait sec) et Çam et Hişil (Çam & Hişil, 2010) (3.7 à 9.5 mg EC/g d'extrait sec). Ces résultats montrent clairement que la fraction en tanins hydrolysables dans les écorces du fruit du grenadier est plus importante que celle des tanins condensés. Saad et al. (Saad et al., 2012) signalent également cette différence entre les teneurs en tanins hydrolysables et tanins condensés dans les écorces des fruits de grenade des différents cultivars tunisiens. Ils expliquent cela par les différences génétiques et environnementales. D'autre part, ils justifient cette différence par la variation de l'épaisseur de l'écorce pour chaque échantillon étudié.

Les proanthocyanidines sont des produits finis oligomères et polymères de la voie de la biosynthèse des flavonoïdes (Díaz-Mula et al., 2019). L'existence des proanthocyanidines dans les aliments, y compris les céréales, les fruits, les noix et les épices, affecte leur texture, leur couleur et leur goût. Toutefois, Ils sont de plus en plus reconnus comme ayant des effets bénéfiques pour la santé humaine en raison de leur puissante capacité antioxydante et de leurs effets protecteurs pour la santé humaine ; réduire le risque de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et les cancers (Díaz-Mula et al., 2019).

Dans la présente étude, la teneur en proanthocyanidines des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles était de l'ordre de 4.79 et 3.87 mg EC/g d'extrait sec, respectivement. Ces valeurs sont plus élevées que celles publiées pour cinq cultivars de grenades largement répandus en Egypte, elles sont de l'ordre de 0.085 à 0.339 mg EC/g pour les extraits méthanoliques de l'écorce et de 0.080 à 0.318 mg EC/g pour les extraits aqueux (Abdel-Hady, 2013). De plus nos résultats sont supérieurs à ceux rapporté par Diaz-Mula et al. (Díaz-Mula et al., 2019) pour la variété espagnole Mollar Elche, dont la teneur en proanthocyanidine dans l'écorce était de l'ordre de 1840.5 µg/g et de 316.2 µg/g pour les graines. L'extrait méthanolique des écorces de grenades récoltées au nord de l'Ile Maurice possède une teneur en proanthocyanidines moins faible 2.48 mg EC/g (Rummun et al., 2013). En revanche, Middha et al. (Middha et al., 2013) ont montré également que l'extrait méthanolique d'écorce renferme une teneur plus importante en proanthocyanidine de l'ordre de 14.09 par rapport à nos résultats, tandis qu'elle est de 9.09 mg EC/g pour l'extrait aqueux.

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS a été testée en utilisant des concentrations croissantes des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade Sefri (de 0 à 0.6 mg/ml). Nos résultats montrent que ces extraits phénoliques présentent tous deux une activité significative de piégeage des radicaux libres de manière dose-dépendante. Cependant, l'écorce a présenté une activité plus élevée que les arilles, comme le montrent les valeurs de la CI50 (écorce : CI50 = 12.49 µg/ml, arilles : CI50 = 21.58 µg/ml). Les valeurs de la CI50 obtenues pour le DPPH dans notre étude étaient beaucoup plus faibles que celles rapportées par Ali et al, qui ont obtenu une CI50 de 14.75 µg/ml pour l'extrait de l'écorce et de 128.27 µg/ml pour celui des arilles (Ali et al., 2014), ce qui indique que l'effet antioxydant était beaucoup plus important dans notre étude. Sabraoui et al (Sabraoui et al., 2020) ont récemment rapporté que trois variétés marocaines avaient des activités antioxydantes plus faibles (EC50 allant de 42.71 à 65.55 µg/ml) que la variété marocaine Sefri). Ces différences pourraient être expliquées par les conditions de culture ou les méthodes d'analyse utilisées. L'activité de piégeage du DPPH des fruits de grenade est associée à leur contenu total en composés phénoliques, anthocyanes et flavonoïdes comme indiqué dans notre résultat. C'est pourquoi l'extrait hydro-alcoolique d'écorce a présenté une activité de piégeage des radicaux plus élevée que l'extrait des arilles. Il est intéressant de noter que si l'on prend en compte la teneur en composés phénoliques, en particulier la punicalagine, l'acide gallique et l'acide ellagique, il existe une corrélation positive entre la teneur en polyphénols et le pouvoir antioxydant de l'extrait de l'écorce, qui est supérieur à celui des arilles (Kalaycioğlu & Erim, 2017; Zaouay et al., 2012). Ceci est en accord avec nos résultats montrant que l'écorce est significativement plus riche en composés phénoliques que les arilles.

La capacité antioxydante par la méthode ABTS a révélé une activité antioxydante plus faible que celle évaluée par le test DPPH. Cependant, l'activité antioxydante de la peau de grenade était plus élevée que celle trouvée dans les extraits de graines. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Elfalleh et al. (Elfalleh et al., 2012), avec des valeurs EC50 de la peau entre 0,062 et 0.085 mg/ml et 4.03 et 4.83 mg/ml pour les extraits de graines. Les données de l'essai ABTS ont montré une bonne corrélation avec les contenus phénoliques.

L'activité de piégeage des radicaux ABTS et DPPH de l'écorce et de la graine de grenade est attribuée à leur capacité à céder l'hydrogène de leur groupe hydroxyle, neutralisant ainsi les radicaux libres en formant des complexes stables. Il est bien établi que les composés phénoliques de l'écorce de grenade contribuent à son activité antioxydante ; des études

précédentes ont mentionné la forte corrélation entre l'activité antioxydante et le contenu phénolique (Amri et al., 2017; Singh et al., 2002).

Nos résultats ont également montré que l'extrait phénolique de l'écorce a une meilleure capacité à piéger les radicaux libres H_2O_2 (CI50 = 19.96 $\mu\text{g/ml}$) que celui des arilles (CI50 = 37.06 $\mu\text{g/ml}$). En termes d'activité antioxydante à la même concentration, l'écorce a présenté le pourcentage le plus élevé, suivi de celui des arilles. À 200 $\mu\text{g/ml}$, le pourcentage d'inhibition était de 87.8% et 64.12%, respectivement, pour l'écorce et les arilles. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux rapporté par Guo et al. (Guo et al., 2007), qui ont montré que l'extrait de l'écorce de grenade d'une variété chinoise avait une activité de piégeage élevée pour le peroxyde d'hydrogène, avec une CI50 de 0.032 $\mu\text{g/ml}$, ce qui est beaucoup plus faible que nos résultats.

L'activité de piégeage du H_2O_2 a probablement été affectée par la concentration des composés phénoliques. Comme les composés phénoliques sont de puissants antioxydants qui brisent les chaînes, ils peuvent accélérer la décomposition de H_2O_2 en H_2O et en oxygène (Bendary et al., 2013). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est très réactif et contribue à la formation de radicaux OH dépendant des ions de métaux de transition et provoquant des dommages oxydatifs à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Gülçin et al., 2010). La spécificité et la sensibilité des tests DPPH, ABTS et H_2O_2 n'ont pas confirmé les activités antioxydantes des extraits phénoliques de la grenade Sefri. C'est pourquoi les tests FRAP, β -carotène, AAT, FTC et TBARS ont été réalisés afin de fournir une évaluation fiable des propriétés antioxydantes des composés phénoliques de la grenade.

Nos résultats pour l'activité antioxydante évaluée par la méthode du FRAP ont montré que l'extrait phénolique de l'écorce a une plus grande capacité à réduire le complexe ferrique tripyridyl-triazine (Fe(III)-TPTZ) en un complexe ferreux (Fe(II)-TPTZ) en raison des capacités de donneur d'électrons de ses composés phénoliques (374.83 mg EAA/g) que celui des arilles (189.83 mg EAA/g). Nos résultats étaient en accord avec ceux obtenus par Li et al. (Li et al., 2006) et Sabraoui et al. (Sabraoui et al., 2020), qui ont trouvé que le pouvoir réducteur de l'extrait d'écorce était plus élevé que celui d'un des arilles. Zeljka et al. ont également rapporté que les extraits d'écorce présentent une forte activité antioxydante (100.25-176.60 μmol Équivalent Trolox/100 g) dans la réduction du complexe Fe(III)-TPTZ (Peršurić et al., 2020). Le pouvoir réducteur des parties de fruits de grenade est probablement dû à l'action des groupes hydroxyle des composés phénoliques, qui peuvent agir comme des donneurs d'électrons. Les composés antioxydants qui agissent comme agents réducteurs

exercent leur effet en donnant un atome d'hydrogène au complexe ferrique, brisant ainsi la réaction en chaîne des radicaux (Li et al., 2006).

Les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade Sefri ont été utilisés pour déterminer leurs capacités antioxydantes par la formation de complexes de phosphomolybdène. Cette méthode est basée sur la réduction de Molybdène (VI) en Molybdène (V) par les composés antioxydants et la formation d'un complexe vert de Molybdène (V) avec une absorption maximale à 695 nm. Les différents extraits de grenade ont montré différents degrés de capacité antioxydante. À des concentrations de 200 et 600 µg/ml, l'extrait phénolique de l'écorce a montré de fortes capacités antioxydantes, tandis que l'extrait des arilles a montré de capacités antioxydantes plus faibles à des mêmes concentrations. Les données expérimentales exprimées en nombre de milligrammes équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extrait sec se sont avérées être entre 67.45 et 34.81 mg EAA/g pour les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles pour une concentration de 600 µg/ml, respectivement. L'extrait des arilles a montré une capacité antioxydante moindre à toutes les concentrations par rapport à celui de l'écorce. Les variations de la capacité antioxydante des extraits de l'écorce et des arilles peuvent être attribuées aux différences dans leurs contenus phénoliques. Des résultats similaires ont été rapporté dans le cas des extraits de grenade (Azizuddin & Ghafoor, 2018; Hadjadj et al., 2018; Negi et al., 2003; Zahin et al., 2010). L'étude réalisée par Zahin et ses collaborateurs sur l'activité antioxydante totale des écorces de grenade par dosage du phosphomolybdène (Zahin et al., 2010) a révélé que l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade a présentait l'activité antioxydante la plus élevée (5067.7 µmol EAA/g d'extrait sec), suivie par l'extrait éthanolique (3323 µmol EAA/ g d'extrait sec), l'extrait acétonique (2481.6 µmol EAA/ g d'extrait sec) et l'extrait d'acétate d'éthyle (862.8 µmol EAA/g d'extrait sec), à une concentration de 80 µg/ml. Toutes ces valeurs étaient supérieures à celles trouvées pour les extraits dans la présente étude. Ces résultats sont en accord avec ceux rapporté par Negi et al (Negi et al., 2003) pour la variété Ganesha. La capacité antioxydante la plus élevée était pour l'extrait méthanolique de l'écorce (2457 µmol EAA/g d'extrait sec), suivie par l'extrait d'acétate d'éthyl (2396 µmol EAA/ g d'extrait sec), l'extrait acétonique (2173 µmol EAA/ g d'extrait sec) et l'extrait aqueux (956 µmol EAA/ g d'extrait sec), à une concentration de 100 µg/ml. En revanche, Azizuddin et Ghafoor ont montré des valeurs inférieures dans le jus de deux variétés de grenade (Kandhari et Bedana) par rapport à nos résultats. La capacité antioxydante pour la variété Bedana était de l'ordre de 671.60 mg EAA/100 ml alors que celle

de la variété Kandhari était moins faible (663.33 mg/100 ml) (Azizuddin & Ghafoor, 2018). De plus, nos résultats étaient supérieurs à ceux rapportés par Hadjadj et ses collaborateurs pour une variété algérienne dont la capacité antioxydante totale était de l'ordre de 23.53 mg EAA/g pour l'extrait hydroéthanolique de l'écorce (Hadjadj et al., 2018). L'activité antioxydante démontrée par les extraits de grenade peut être due à la présence de polyphénols, tels que les tannins ellagiques, l'acide ellagique et l'acide gallique (Gil et al., 2000).

Nous avons évalué le potentiel antioxydant des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles pour la peroxydation lipidique en utilisant le test de blanchiment β -carotène/acide linoléique, qui est basé sur une diminution de la couleur du β -carotène suite à sa réaction avec les radicaux générés lors de l'oxydation de l'acide linoléique. Nos résultats montrent que les extraits phénoliques testés provoquent une diminution de l'oxydation de l'acide linoléique. L'ajout de l'extrait phénolique de l'écorce ou celui des arilles a empêché la génération de radicaux libres par l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. À 2 mg/ml, l'écorce a présenté une activité antioxydante significativement plus élevée (86.83%) que les arilles (55.64%). Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans une étude menée par Singh et al. (Singh et al., 2002), qui ont également signalé que l'extrait d'écorce présentait une activité antioxydante plus élevée (83%) que l'extrait d'arille (22.6%). D'autre part, Derakhshan et al. (Derakhshan et al., 2018) ont rapporté que l'extrait de pelure présentait une activité antioxydante de 58 % par rapport à 54 % pour l'extrait d'arille, tandis qu'Orak et al. (Orak et al., 2012) ont rapporté qu'il n'y avait pas de différence significative dans l'activité antioxydante entre le jus de grenade (47.87%) et l'extrait de pelure (46.24%). Dans le système β -carotène-acide linoléique, l'oxydation de l'acide linoléique génère des espèces radicalaires en raison de l'abstraction d'hydrogène, qui se produit dans les groupes méthylène de l'acide linoléique. Les radicaux libres oxydent le β -carotène par des hydroperoxydes. La présence d'antioxydants dans l'extrait neutralise les radicaux libres linoléiques ainsi que tout autre radical libre formé dans le système. L'oxydation du β -carotène dépend donc de l'activité antioxydante des extraits (Mariod et al., 2009). Nos résultats montrent clairement que les extraits phénoliques de la grenade Sefri réduisent l'oxydation du β -carotène.

L'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique a également été déterminée comme un indice de l'activité antioxydante à long terme. La peroxydation des lipides se produit par l'intermédiaire de radicaux qui retirent des atomes d'hydrogène des carbones méthylènes dans les acides gras polyinsaturés. L'inhibition de la peroxydation causée par les extraits phénoliques de la grenade Sefri à la fin des 10 jours d'incubation était significativement plus

élevée. L'activité inhibitrice la plus élevée a été observée pour l'écorce suivie par l'acide ascorbique. La valeur inférieure a été observée pour l'extrait des arilles.

Les résultats de la méthode du thiocyanate ferrique (FTC) ont montré que l'extrait méthanolique de l'écorce avait une plus grande activité antioxydante par rapport à l'extrait des arilles. Les études ont affirmé que l'extrait aqueux de plantes médicinales avait une forte activité antioxydante contre la peroxydation lipidique. La réaction dans la méthode FTC est due aux composés de l'oxydation de l'acide linoléique dans lequel, le peroxyde réagit avec le chlorure ferreux pour former un pigment rougeâtre de chlorure ferrique (Al-Naqeeb et al., 2009). Les peroxydes sont lentement décomposés en composés moléculaires inférieurs au cours de l'oxydation (Behbahani et al., 2007).

Dans cette étude, les résultats du test du thiocyanate ferrique (FTC) ont été confirmés par les données de la méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA). D'après ces résultats, l'extrait méthanolique de l'écorce avait une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait des arilles. Cependant, les jus fermentés de grenade étaient également capables d'inhiber la peroxydation de l'acide linoléique pendant une longue période d'incubation (8 jours) (Pontonio et al., 2019). L'activité antioxydante par la méthode du thiocyanate ferrique est plus élevée que l'activité antioxydante du test TBA dans les extraits phénoliques de la grenade (Behbahani et al., 2007). Après un certain temps, le malonaldéhyde, un produit secondaire de la peroxydation des lipides, se transforme en alcool et en acide. L'alcool et l'acide ne peuvent pas être détectés avec un spectrophotomètre (Rahmat et al., 2004). La méthode FTC indique la quantité de peroxyde dans les étapes initiales de la peroxydation lipidique (Rahmat et al., 2004; Saha et al., 2004). Alors que la méthode de l'acide thiobarbiturique indique la quantité de peroxyde au stade secondaire de la peroxydation lipidique (Rahmat et al., 2004). Par conséquent, l'activité antioxydante élevée trouvée par la méthode du thiocyanate ferrique indique que la quantité de peroxyde au stade initial de la peroxydation des lipides était plus grande que la quantité de peroxyde au stade secondaire. Ainsi, ces données suggèrent que l'extrait phénolique de l'écorce de la grenade Sefri avait un meilleur effet bénéfique contre la peroxydation lipidique par rapport à l'extrait des arilles.

Les TBARS sont un important bio-marqueur du stress oxydatif, mesurant les produits de l'oxydation des lipides présents dans le sang (Aleksandrova et al., 2021; Cammisotto et al., 2021). Des niveaux plus faibles de TBARS sont observés chez les personnes jeunes et en bonne santé. Avec l'âge, et dans le cas de certaines maladies comme les maladies coronariennes, la quantité de TBARS circulant dans le sang augmente, ce qui indique des

niveaux élevés de stress oxydatif (Cammisotto et al., 2021). Les taux sériques de TBARS sont fortement prédictifs d'événements cardiovasculaires chez les personnes atteintes de maladie coronarienne stable, indépendamment des facteurs de risque traditionnels et des marqueurs inflammatoires (Cammisotto et al., 2021).

Dans cette présente étude, les concentrations de TBARS représentant les produits de peroxydation lipidique ont été mesurés dans le plasma humain. Les résultats de cette étude ont révélé que le cuivre a augmenté de manière significative les niveaux de TBARS plasmatiques par rapport aux traitements avec les extraits phénoliques de la grenade, qui ont diminué les niveaux de TBARS plasmatiques. Le BHT et les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade Sefri ont diminué de manière significative les valeurs des TBARS tout au long de la période du test par rapport au contrôle positif. Les échantillons contenant l'extrait de l'écorce de grenade ont montré des valeurs de TBARS plus faibles que celles du BHT, et de l'extrait phénolique des arilles. La meilleure capacité antioxydante de l'extrait d'écorce de grenade par rapport aux celui des arilles peut être due aux concentrations des composés phénoliques plus élevés dans l'extrait d'écorce de grenade. De même, Shahamirian et ses collaborateurs ont rapporté que l'extrait d'écorce de grenade était plus efficace que le jus de grenade et le BHT pour réduire l'oxydation lipidique (Shahamirian et al., 2019). De plus, Aviram et al. (Aviram et al., 2000) ont montré la capacité impressionnante de la grenade (variété du Wonderful) à inhiber la peroxydation lipidique *in vitro* et *ex vivo*, ainsi que dans les LDL et HDL isolées, dans plusieurs systèmes d'oxydation différents, notamment les ions de métaux de transition, les générateurs de radicaux libres et les cellules. Par plus d'un test (TBARS, peroxyde lipidique et formation de diène conjugué), ils ont démontré la capacité antioxydante de la grenade à piéger les radicaux libres, un mécanisme d'action majeur de certains antioxydants naturels puissants, y compris la vitamine E et les flavonoïdes (Mucha et al., 2021; Parcheta et al., 2021).

4 Conclusion et perspectives

A la lumière de ces résultats, on constate que l'extrait phénolique de l'écorce de la grenade Sefri est une source riche en composés phénoliques et qui possède une activité antioxydante puissante, ce qui suggère que ce produit est une source naturel d'antioxydants très puissants. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour isoler et caractériser les composés phénoliques individuels responsables de cette activité et aussi pour comprendre leur mode d'action, ce qui pourrait fournir des avantages pour la santé humaine et exploité ces composés à des fins pharmaceutiques et thérapeutiques.

Chapitre II : Évaluation de l'effet hypocholestérolémiant des extraits phénoliques de la grenade « Sefri » chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique

1 Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent aujourd'hui la principale cause de décès dans le monde, avec des taux d'incidence et de mortalité très élevés (Ashoor et al., 2019; Ibrahim & Mohamed, 2021). Le stress oxydant est connu pour être un acteur clé dans le développement des maladies coronariennes et a été bien décrit comme le mécanisme à l'origine d'une série de problèmes de santé, tels que l'hypertension, la dyslipidémie, le syndrome métabolique, le diabète sucré et l'obésité (Pignatelli et al., 2018). Dans ce contexte, il est bien établi que les altérations de plusieurs enzymes ou médiateurs pro-oxydants et antioxydants, notamment la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, la myéloperoxydase, la glutathion réductase (GSH), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx), sont les principaux mécanismes à l'origine de l'initiation de la réponse au stress oxydatif dans les MCV (Pignatelli et al., 2018).

Parmi les divers facteurs de risque, de nombreuses études et rapports ont mis en évidence la contribution significative de l'hyperlipidémie au développement et à la progression des MCV induites par les dommages oxydatifs (Daiber et al., 2021; Guevara-Cruz et al., 2021). L'hyperlipidémie est un trouble du métabolisme lipidique caractérisé par une augmentation significative du cholestérol total circulatoire et du cholestérol LDL (Guevara-Cruz et al., 2021). Il a été démontré que l'hyperlipidémie est la principale cause d'athérosclérose chez l'Homme et les animaux en augmentant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), donnant lieu à des LDL oxydées (ox-LDL) (Olea et al., 2014). À cet égard, des taux sériques plus élevés de ROS, de peroxydes lipidiques et de malondialdéhyde (MDA) ont été identifiés chez les patients hyperlipidémiques et les modèles animaux soumis à un régime riche en graisses (High Fat Diet) (Pignatelli et al., 2018).

Le cholestérol est un composant cellulaire important qui se trouve principalement dans les membranes cellulaires, et il joue un rôle capital dans la structure des cellules et la régulation de la signalisation cellulaire (Aguilar-Ballester et al., 2020; Boer et al., 2018; Luo et al., 2020; Nakano et al., 2019). Chez les patients et les modèles animaux, l'hypercholestérolémie peut se développer comme une maladie héréditaire (l'hypercholestérolémie familiale) ou comme une conséquence d'un régime hypercalorique

déséquilibré ou d'autres troubles métaboliques (par exemple l'obésité) (Csonka et al., 2016). Les études ont identifié l'hypercholestérolémie comme un facteur de risque indépendant pour le développement de l'athérosclérose, de l'ischémie myocardique et d'autres formes de MCV (Csonka et al., 2016). Des analyses approfondies ont été réalisées dans ce domaine et ont montré que l'effet de l'hypercholestérolémie est principalement médié par la génération des ROS (Chtourou et al., 2015; Csonka et al., 2016). En effet, il a été constaté que l'hypercholestérolémie induit des ROS et des espèces réactives d'azote, alors que les médicaments hypocholestérolémiants atténuent significativement le stress oxydant induit par l'hypercholestérolémie chez les patients (Chtourou et al., 2015; Csonka et al., 2016).

La consommation d'un régime hypercalorique est communément associée au stress oxydant cellulaire. Une étude récente de Yu et al. a montré que le stress oxydant induit par le régime hypercalorique altère l'homéostasie lipidique chez les souris en bloquant l'activité du facteur nucléaire hépatocytaire 4 α (HNF-4 α), et en réduisant la sécrétion de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) (Yu et al., 2018). D'autre part, les rats soumis à un régime hypercalorique et/ou un régime riche en fructose peuvent développer un ensemble d'anomalies physiologiques, notamment une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose, une hypercholestérolémie, une hypertriglycéridémie et une hypertension artérielle (Carreres et al., 2021; Rodríguez-Correa et al., 2020; Taylor et al., 2018; Xue et al., 2021; Zimmerman et al., 2021).

Les antioxydants naturels tels que la vitamine C, la vitamine A, la vitamine E, les caroténoïdes, certains minéraux (par exemple Zn, Mn, Cu et Se) et les polyphénols (flavonoïdes, acides phénoliques, stilbènes, lignanes) sont considérés comme des puissants antioxydants pour la prévention des dommages oxydatifs, et peuvent également retarder le processus de vieillissement et réduire les complications liés à l'athérosclérose et la dyslipidémie comme les maladies cardiovasculaires (Kiokias et al., 2018; Zhou et al., 2021).

La grenade (*Punica granatum*) est un fruit comestible dont les propriétés nutraceutiques et pharmacologiques ont été rapportées (Wu & Tian, 2017). Des études sur des cultures cellulaires, des souris et des humains montrent l'effet des flavonoïdes présents dans le jus, qui sont associés à la prévention des maladies cardiovasculaires, de l'obésité, du diabète et du cancer (Hou et al., 2019).

Cependant, l'effet hypocholestérolémique du jus, des graines ou l'écorce de grenade par rapport à son activité antioxydante est peu décrit au niveau clinique ou expérimental. Dans une étude, l'extrait aqueux de l'écorce de grenade « Sefri » a amélioré de manière

significative les paramètres lipidiques chez les souris hypercholestérolémiques (Harnafi et al., 2018). Cependant, il existe peu de données concernant l'extrait méthanolique de cette variété. Par conséquent, notre travail actuel vise à étudier l'activité hypolipémiante des extraits méthanoliques riches en composés phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri », chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique et hypercholestérolémique.

2 Résultats

2.1 Test de toxicité aiguë (DL50)

Nous avons réalisé un test de toxicité aiguë des extraits phénoliques de grenade chez des rats *Wistar* pour évaluer la toxicité et sélectionner la dose expérimentale. Les extraits ont été administrés par voie orale à une dose croissante jusqu'à 2 g/kg de poids corporel. Tous les rats ont été suivis individuellement pour vérifier la mortalité et les changements de comportement pendant les 30 premières minutes, puis à 2, 4, 8, 24, 48 heures, et jusqu'au 14^{ème} jour. La période d'observation de 14 jours pendant l'étude de toxicité aiguë par voie orale et les mesures du poids corporel n'ont révélé aucune mortalité ni effet toxique chez les animaux pour les arilles. Cependant, avec l'extrait de l'écorce, un seul décès a été relevé pour la dose de 1.5 g/Kg et 3 rats pour la dose de 2 g/Kg de poids corporel. Ce résultat indique que la mort survient à une dose très élevée et qu'il s'agit pratiquement d'un produit non toxique. De plus, aucune anomalie n'a été constatée au niveau du cœur, du foie, de l'estomac, de la rate, des poumons, et des reins pour les deux extraits. Ces observations de toxicité aiguë orale suggèrent que le fruit de grenade est pratiquement considéré comme un produit non toxique (**Annexe 3**).

2.2 Effet hypocholestérolémiant des extraits phénoliques de la grenade

2.2.1 Étude préliminaire (Induction de l'hyperlipidémie par le Triton WR 1339)

a. Profil lipidique plasmatique

Les effets des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri » sur le profil lipidique ont été étudiés chez les rats *Wistar* soumis à un traitement hypercholestérolémique aiguë par injection du Triton WR 1339. Les résultats illustrés dans la **Figure 52** montrent une augmentation significative ($P < 0,001$) des niveaux de lipides plasmatiques chez les rats soumis au (Triton WR 1339). Cependant, l'administration des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles, chez ces rats (WR 1339) induit une réduction significative ($P < 0,001$) des paramètres lipidiques.

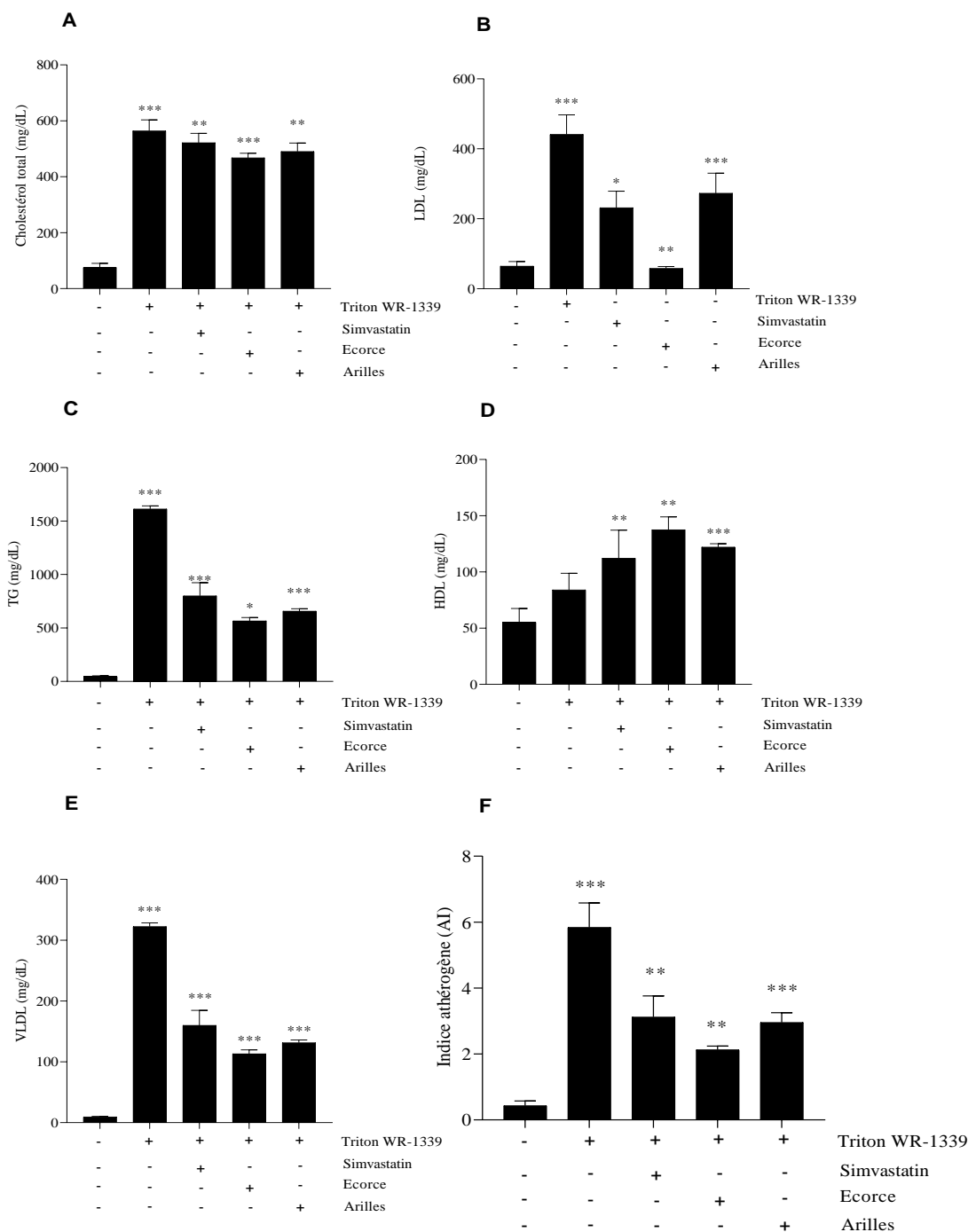


Figure 52: Effet des extraits phénoliques sur le profil lipidique chez le rat Wistar rendu hypercholestérolémique sous l’effet du Triton WR-1339. **(A)** cholestérol total (CT), **(B)** cholestérol LDL (C-LDL), **(C)** triglycéride (TG), **(D)** cholestérol HDL (C-HDL), **(E)** cholestérol VLDL (C-VLDL) du plasma des rats, et **(F)** l’indice d’athérogénicité (AI). La simvastatine a été utilisée comme standard interne.

Les données sont rapportées en tant que moyenne \pm sem pour cinq à six animaux par groupe. *Comparaison avec le groupe témoin. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives par rapport au témoin.

En effet, on remarque une réduction significative des taux de cholestérol total (entre 13.03 % et 17.07 %) (**Figure 52 A**), de triglycérides (entre 59.20 % et 64.89 %) (**Figure 52 C**), de LDL (entre 38.10 % et 86.80 %) (**Figure 52 B**) et de VLDL (entre 59.20 % et 64.89 %) (**Figure 52 E**) par les extraits phénoliques des arilles et de l'écorce, respectivement. En revanche une augmentation significative ($P < 0,001$) a été observée dans les concentrations du cholestérol HDL (entre 45.24 % et 63.70 %) après 24 heures de traitement par les extraits des arilles et de l'écorce de grenade respectivement, en comparaison avec les autres groupes (**Figure 52 D**). De plus l'indice d'athérogénicité (AI) a également diminué de manière significative ($P < 0,001$) (entre 49.48 % et 63.52 %) pour les groupes des arilles et de l'écorce, respectivement après 24 h de traitement en le comparant avec les autres groupes (**Figure 52 F**).

b. Statut antioxydant (TBARS)

Les résultats de la **Figure 53** montrent que l'injection du Triton (WR 1339) induit une augmentation significative ($p < 0.001$) du taux plasmatique des TBARS (66.19 %). En revanche, cette augmentation a été contrée par l'administration des extraits phénoliques qui ont induit une réduction significative ($p < 0.001$) (entre 67.61 % et 76.81 % pour les arilles et l'écorce, respectivement). Ces taux de réduction restent comparables à celui induit par l'administration de la simvastatine (72.74 %).

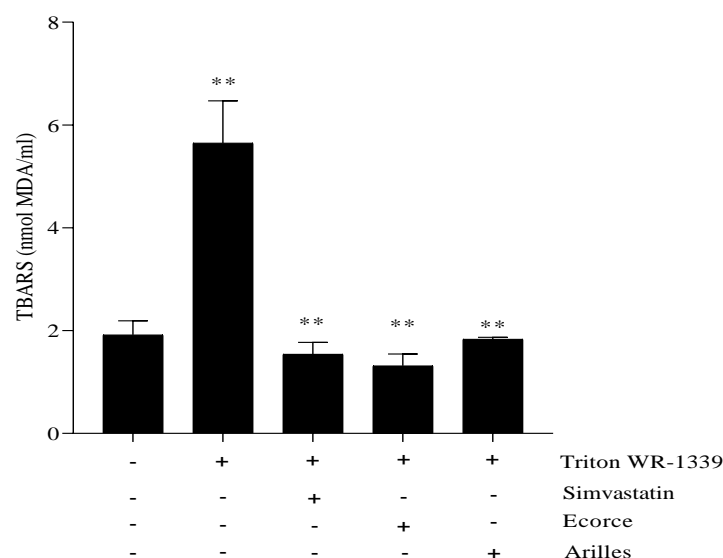


Figure 53: Effet du Triton WR-1339, de la simvastatine et de la grenade sur les marqueurs du stress oxydatif du plasma des rats *Wistar*.

Les données sont rapportées en tant que moyenne \pm sem pour cinq à six animaux par groupe.

** $p < 0,01$ indique des différences significatives par rapport au témoin.

2.3 Étude de l'effet antiathérogène de la grenade « Sefri » chez le rat

Cette étude a été conduite chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique et riche en cholestérol (RHCC) pendant 90 jours.

2.3.1 Poids corporel, IMC et Indices Athérogènes

L'administration des extraits de grenade riches en composés phénoliques a réduit de manière significative la prise de poids corporel et les indices athérogènes par rapport au groupe témoin et aux rats soumis au régime (RHCC) (**Tableau 20**). Les indices athérogènes à savoir l'indice d'athérogénicité (IA), l'indice du risque cardiaque (IRC) ont été calculés et étaient significativement plus élevés dans le groupe (RHCC) comparé au groupe témoin (**Tableau 20**). Ces indices sont diminués sous l'effet des extraits phénoliques de grenade, ce qui laisse supposer une augmentation du risque de survenue des maladies grenade cardiovasculaires (MCV) avec le régime (RHCC) et un effet protecteur des extraits de la. Le pourcentage de protection était plus élevé ($80.61 \pm 10.82 \%$, $72.48 \pm 8.12 \%$ et $64.46 \pm 12.27 \%$) pour les groupes traités par les extraits de l'écorce, les arilles et le fruit entier de grenade respectivement par rapport à la simvastatine (49.24 ± 24.11) (**Tableau 20**). Le traitement avec le fruit de grenade a réduit les indices athérogènes, indiquant une protection contre la progression de l'athérosclérose et, par la suite une réduction du risque de MCV.

À la fin de la période expérimentale (jour 90), le groupe (RHCC) avait une prise de poids plus importante que les autres groupes avec un IMC plus important chez le groupe RHCC (**Figure 54, Figure 55**).

Tableau 20: Effet des extraits de grenade sur la prise de poids les indices athérogènes

Groupe	Prise de poids (g)	CRR (%)	CPI (%)	Protection (%)
Témoin	78.39 ± 19.06	5.22 ± 1.82	0.27 ± 0.10	-
RHCC	200.95 ± 55.68 ^{***}	8.15 ± 3.02 [*]	0.15 ± 0.06 [*]	-
RHCC + Simvastatine	80.28 ± 35.25 ^{##}	4.23 ± 0.86 ^{##}	0.28 ± 0.06 ^{###}	49.24 ± 24.11
RHCC + Écorce	80.44 ± 18.98 ^{###}	2.18 ± 0.47 ^{###}	0.60 ± 0.16 ^{###}	80.61 ± 10.82
RHCC + Arilles	83.54 ± 14.59 ^{###}	2.84 ± 0.62 ^{###}	0.49 ± 0.20 ^{###}	72.48 ± 8.12
RHCC + Fruit entier	89.67 ± 29.34 ^{##}	3.30 ± 0.71 ^{###}	0.44 ± 0.15 ^{###}	64.46 ± 12.27 ^{••}

Les données sont rapportées en tant que moyenne ± sem pour cinq à sept animaux par groupe. *Comparaison avec le groupe témoin. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, et *** $p < 0.001$ indiquent des différences significatives par rapport au témoin. #Comparaison avec le groupe RHCC. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, et ### $p < 0.001$ indiquent des différences significatives par rapport au groupe RHCC. •Comparaison avec

le groupe traité par l'écorce. ** $p < 0.01$ indique une différence significative par rapport au groupe traité par l'écorce.

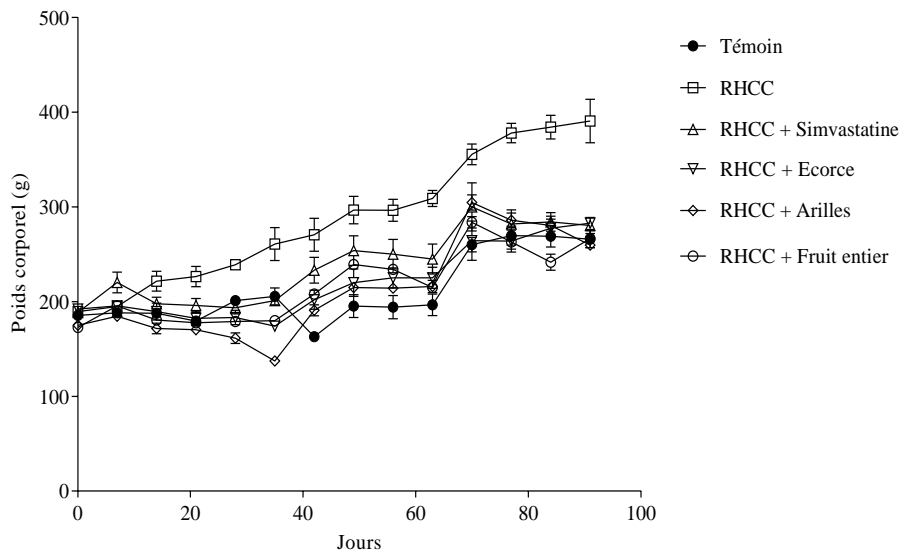


Figure 54: Effet des extraits phénoliques de grenade sur l'évolution du poids corporel chez des rats *Wistar* soumis à un régime (RHCC).

Les données sont rapportées en tant que moyenne \pm sem pour 6 ou 8 rats par groupe.

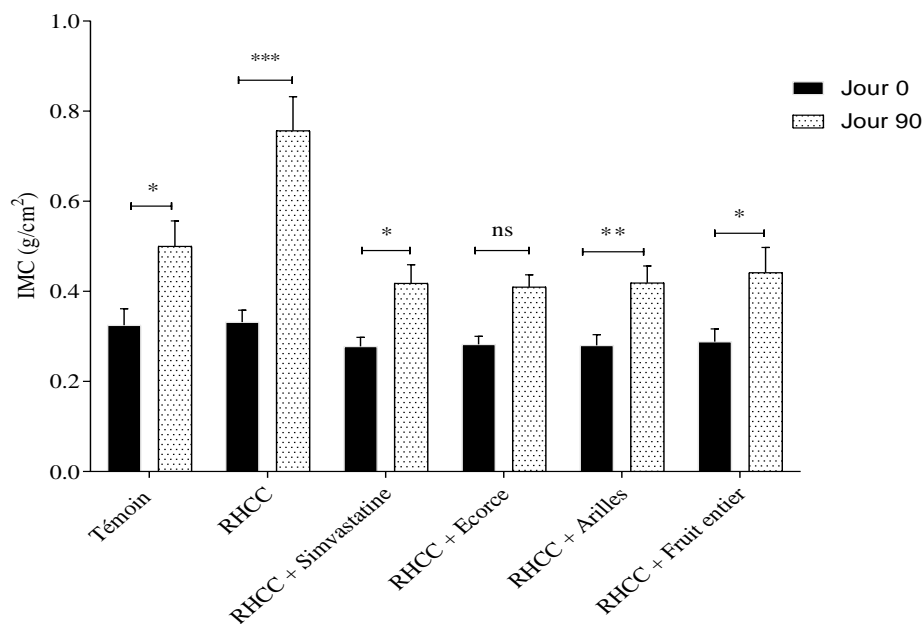


Figure 55: Effet des extraits phénoliques de grenade sur l'indice de masse corporel chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique.

Les données sont rapportées en tant que moyenne \pm sem pour 6 ou 8 rats par groupe. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ indiquent des différences significatives entre J0 et J90 pour chaque groupe. ns : non significatif.

Les changements dans le poids corporel initial et final dans les groupes témoins et expérimentaux sont présentés dans la **Figure 56**. Les résultats ont montré que l'administration des extraits de grenade a diminué l'augmentation du poids corporel final par rapport au groupe RHCC d'une manière significative ($p < 0.001$). Les résultats ont montré que le traitement par les extraits phénoliques de grenade a diminué le poids des organes par rapport au groupe RHCC, d'une manière significative (**Figure 57**).

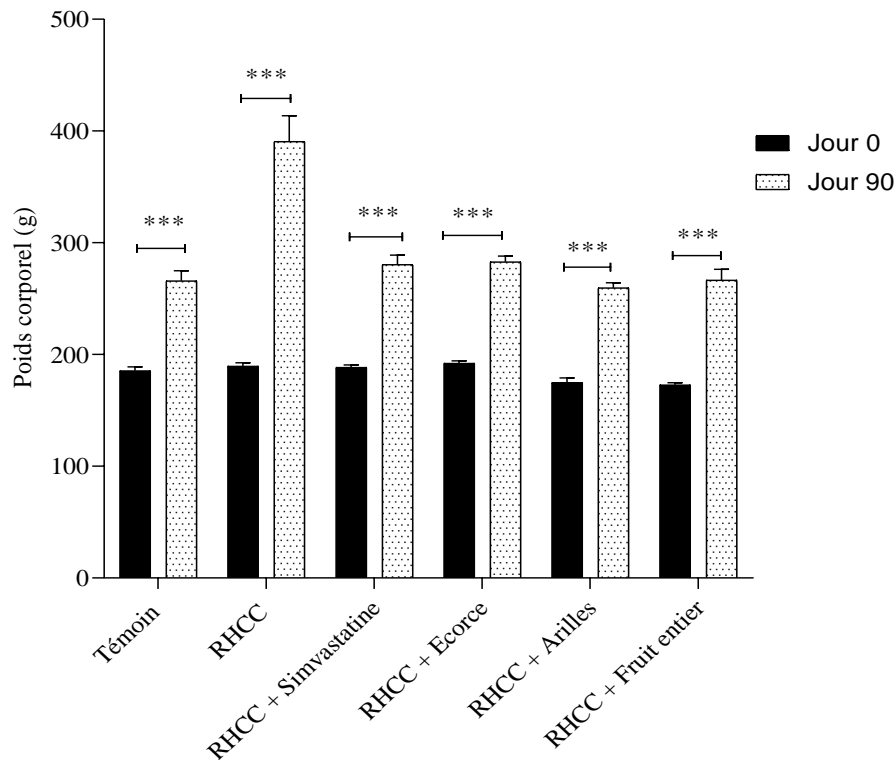


Figure 56: Effet des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade sur le poids corporel chez des rats soumis à un régime hypercalorique.

*Les données sont rapportées en tant que moyenne \pm sem pour 6 ou 8 rats par groupe. *** $p < 0.001$ indique des différences significatives entre J0 et J90 pour chaque groupe.*

L'effet des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri » sur le poids des organes a été étudié chez les rats *Wistar* soumis à un régime hypercholestérolémique et hypercalorique chronique. Les résultats illustrés dans la **Figure 57** montrent une augmentation significative ($P < 0,001$) du poids des organes chez les rats hypercholestérolémique. Cependant, l'administration des extraits phénoliques de l'écorce, des arilles et du fruit entier de grenade chez ces rats induit une augmentation significative ($P < 0,001$) du poids des organes par rapport au témoin. En effet, on remarque une augmentation significative du poids du foie, de l'aorte, du cœur, des reins, du cerveau, du

tissu adipeux, et du pancréas avec des pourcentages de l'ordre de 33.59% (**Figure 57 A**), 4.7% (**Figure 57 B**), 21.48% (**Figure 57 C**), 23.38% (**Figure 57 D**), 11% (**Figure 57 E**), 50.57% (**Figure 57 F**), 55.14% (**Figure 57 G**), respectivement. Cependant, une réduction significative ($P < 0,001$) a été observée dans le poids de ces organes chez les groupes traités par l'extrait d'écorce, des arilles et du fruit entier de grenade. Pour l'extrait phénolique de l'écorce une réduction a été observée dans le poids du foie avec un pourcentage de 17.98% (**Figure 57 A**). En revanche, l'extrait des arilles et celui du fruit entier à provoquer une diminution significative du poids du foie avec un pourcentage plus élevé que celui de l'écorce (28.07% et 18.29%, respectivement). Pour l'aorte, l'écorce à provoquer une réduction significative du poids (55.17%) en le comparant avec celui des arilles et du fruit entier (37.93%) (**Figure 57 B**). En revanche, aucune différence significative n'a été observé entre le poids du cœur du groupe RHCC et celui traité par l'extrait phénolique d'écorce. Cependant, les deux extraits des arilles et du fruit entier ont diminué significativement ($p < 0.05$) le poids du cœur avec des pourcentages de l'ordre de 23.70% (**Figure 57 C**). L'administration des extraits phénoliques de grenade (250 mg/kg de poids corporel) a significativement ($p < 0.001$) diminué le poids des reins par rapport à ceux des rats du groupe RHCC (18.54%, 20.16%, et 21.77% pour l'écorce, les arilles et le fruit entier, respectivement) (**Figure 57 D**). La réduction du poids du cerveau des rats traités par l'extrait phénolique des arilles était statistiquement significatif (9.56%, $p < 0.05$) par rapport à celui des rats traités avec l'écorce et le fruit entier (9.56% et 13.39%, respectivement) (**Figure 57 E**). Pour le tissu adipeux, tous les extraits de grenade ont provoqué une diminution significative ($p < 0.01$) du poids en les comparant avec celui du groupe RHCC avec des pourcentages de l'ordre de 80.70%, 82.42% et 87.32% pour l'extrait d'écorce, des arilles et du fruit entier, respectivement (**Figure 57 F**). Finalement, aucune différence significative n'a été enregistré pour le poids du pancréas entre le groupe RHCC et celui traité par l'écorce. Cependant, les extraits des arilles et du fruit entier ont diminué d'une manière significative ($p < 0.05$) le poids du pancréas (56.81% et 46.17%, respectivement) (**Figure 57 G**).

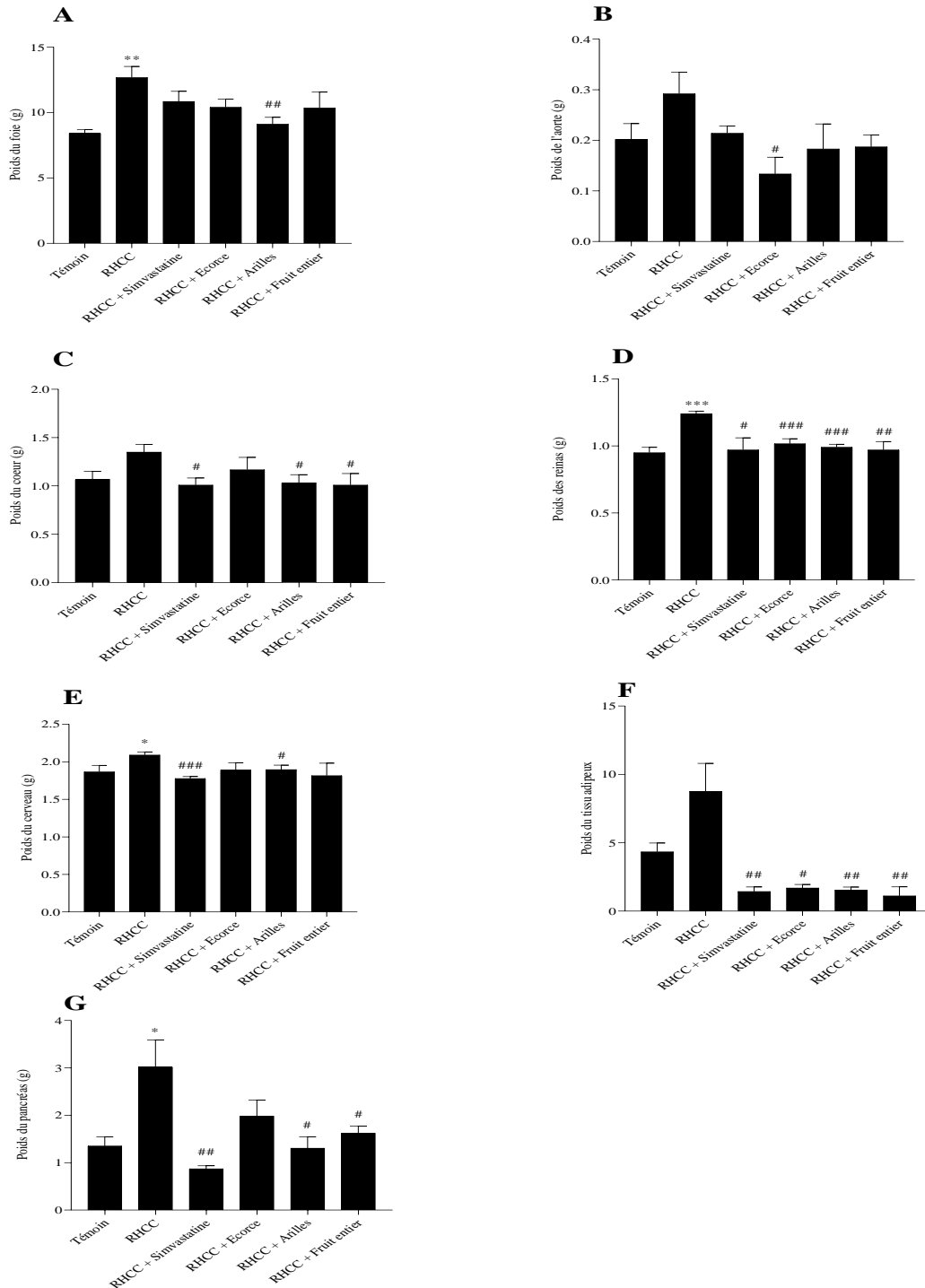


Figure 57: Effet des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade sur le poids des différents organes des rats soumis à un régime hypercalorique. (A) foie, (B) aorte, (C) cœur, (D) les reins, (E) cerveau, (F) tissu adipeux, (G) pancréas.

Les données sont rapportées en tant que moyenne \pm sem pour cinq à sept animaux par groupe. *Comparaison avec le groupe témoin. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, et $***p < 0.001$ indiquent des différences significatives par rapport au témoin. #Comparaison avec le groupe RHCC. $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$, et $\#\#\#p < 0.001$ indiquent des différences significatives par rapport au groupe RHCC.

2.3.1.1 Cholestérol total, triglycérides, LDL, VLDL et HDL

Les résultats obtenus dans la présente étude, ont montré une augmentation significative des concentrations de lipides plasmatiques et hépatiques (CT, TG, C-LDL, C-VLDL) avec une réduction du taux de HDL chez le groupe RHCC, confirmant l'induction d'une hyperlipidémie chez les rats expérimentaux. Le traitement à la simvastatine (10 mg/Kg) et aux extraits de grenade (250 mg/Kg) a permis de rétablir le profil lipidique par rapport au groupe RHCC après 12 semaines. Chez le groupe RHCC, la grenade a montré qu'elle prévenait l'hyperlipidémie en diminuant l'IMC et la prise de poids.

Nos résultats illustrés dans la **Figure 58, A-E**, ont montré que l'administration d'extrait phénolique d'écorces (250 mg/kg) réduit significativement ($p < 0.001$) le taux plasmatique des TG de 50.19 %, du C-VLDL de 50.20 %, du C-LDL de 58.25 % et du CT de 52.34 %, lorsque comparés au groupe RHCC. Fait intéressant, une augmentation significative du taux plasmatique du C-HDL de 42.04 % a été notée à la suite du même traitement par l'extrait phénolique d'écorces. De plus, l'effet de l'extrait phénolique des arilles de grenade (250 mg/kg) a également montré un effet antiathérogène en réduisant les taux plasmatiques des TG de 26.55 %, du C-VLDL de 26.55 %, du C-LDL de 35.28 % et du CT de 26.19 %, et une augmentation du taux plasmatique du C-HDL de 50.73 % comparés au groupe RHCC. Cependant, cet effet reste moins prononcé par rapport à celui de l'extrait phénolique d'écorces.

Une augmentation des niveaux de HDL-C a été observée chez les rats traités avec les extraits phénoliques de grenade (**Figure 58 D**). Les résultats ont indiqué que les niveaux de C-HDL des rats du groupe RHCC étaient significativement inférieurs par rapport à ceux des rats traités avec la grenade et le médicament de référence, simvastatine. De plus, il n'y avait pas de différence significative dans les niveaux de HDL-C entre les rats du groupe témoin et les rats du groupe RHCC. D'autre part, les niveaux de HDL-C étaient significativement plus élevés dans le groupe de rats traités avec 250 mg/kg de poids corporel de l'extrait des arilles par rapport au groupe témoin ($p < 0,001$, **Figure 58 D**).

Les résultats ont montré des niveaux significativement élevés de C-LDL dans le groupe des rats RHCC par rapport aux groupes de rats traités par l'extrait de grenade et au groupe témoin ($p < 0,01$; **Figure 58 C**). De plus, une diminution dans les niveaux de LDL-C des rats traités avec les extraits de grenade était remarquée par rapport de celle des rats traités avec le médicament de référence, simvastatine (**Figure 58 C**). Il est intéressant de noter que les

niveaux de LDL-C des rats du groupe témoin normal et ceux des rats traités avec l'extrait de l'écorce et celui du fruit entier de la plante étaient comparables ($p < 0,001$; **Figure 58 C**).

Pour les niveaux de VLDL, les résultats obtenus indiquent que les rats obèses non traités présentaient des niveaux de VLDL significativement plus élevés que les rats traités par l'extrait de grenade et le groupe témoin ($p < 0,001$; **Figure 58 E**). Le traitement des rats avec l'extrait de l'écorce a montré des niveaux de VLDL plus bas par rapport à ceux des rats traités par la simvastatine. Il est intéressant de noter que les niveaux de VLDL chez les rats traités par l'extrait de l'écorce étaient comparables à ceux des rats du groupe témoin normal (**Figure 58 E**).

Comme l'indiquent les résultats, les traitements avec l'extrait de grenade et le médicament de référence, la simvastatine, ont provoqué une réduction des niveaux de glucose sanguin à jeun chez les rats sous un régime hypercalorique RHCC de la 1^{ère} à la 12^{ème} semaine de la période d'étude (**Figure 59**). Cependant, les rats du groupe témoin normal et du groupe traité par la plante ont indiqué une stabilité des niveaux de glycémie à jeun tout au long de la période expérimentale (**Figure 59**). Les modèles de rats auxquels on a administré l'extrait de grenade à une dose de 250 mg/kg de poids corporel ont présenté une diminution des niveaux de glucose sanguin de la 3^{ème} semaine jusqu'à la 12^{ème} semaine par rapport au groupe RHCC (**Figure 59**). Au contraire, les rats du groupe RHCC ont indiqué une augmentation de la glycémie à jeun de 61 ± 3.94 mg/dL dans la première semaine à 127.16 ± 26.07 mg/dL dans la dernière semaine de la période de l'étude (**Figure 59**). Au 40^{ème} jour de l'étude, les résultats ont montré que les rats du groupe RHCC avaient des niveaux de glucose sanguin plus élevés que tous les autres groupes expérimentaux (**Figure 58 F** et **Figure 59**). Cependant, les rats traités par l'extrait de grenade ont provoqué une diminution significative des niveaux de glucose dans le sang pendant la même semaine (**Figure 59**). En outre, les effets hypoglycémisants de l'extrait étaient comparables à ceux observés chez les rats traités par la simvastatine au cours de la même période (**Figure 58 F**, **Figure 59** et **Figure 60**).

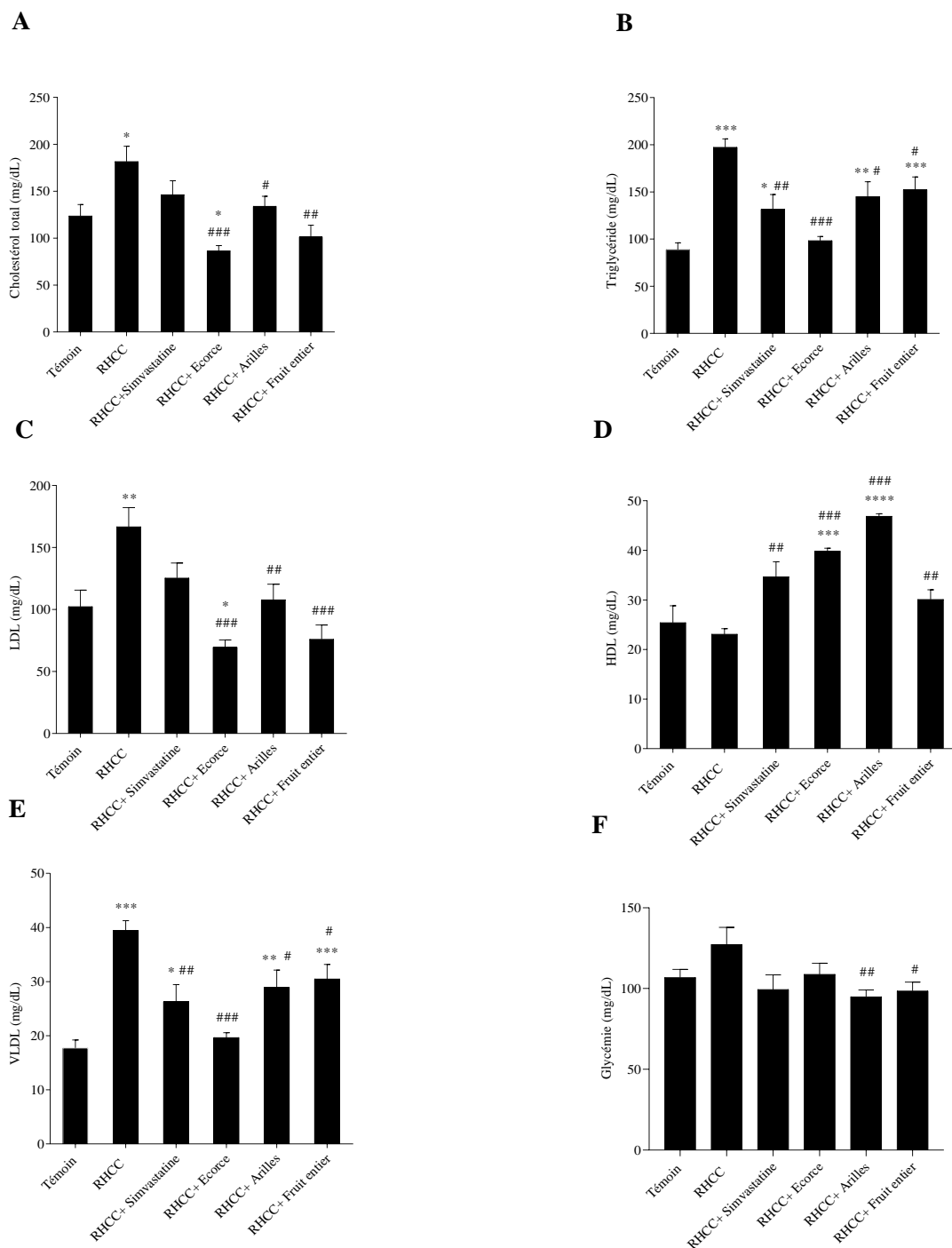


Figure 58: Effet des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade sur le profil lipidique et la glycémie des rats soumis à un régime hypercalorique. (A) Cholestérol total, (B) Triglycéride, (C) LDL, (D) HDL, (E) VLDL, et (F) Glycémie.

Chaque résultat représente la moyenne \pm sem pour 5 à 8 rats. * <0.05 , ** <0.01 , et *** <0.001 (comparé au groupe témoin), # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ (comparé au groupe RHCC) représentent des différences significatives (test de Student).

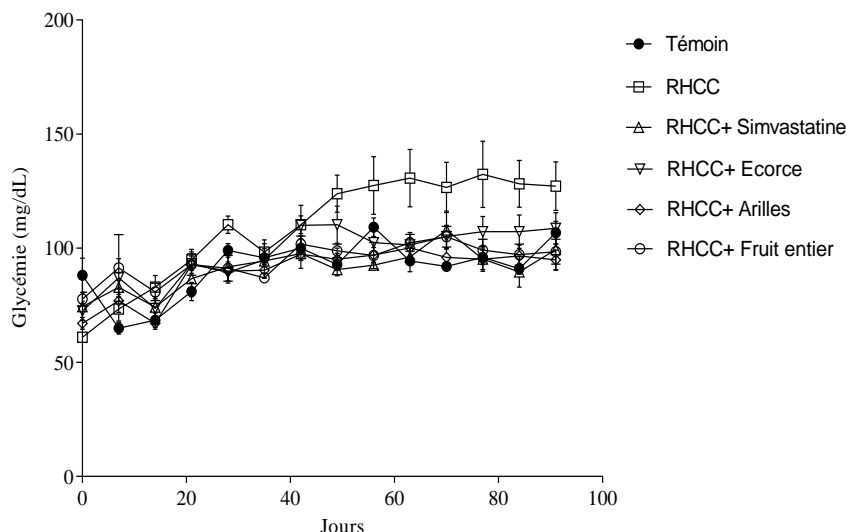


Figure 59: Effet des extraits phénoliques de grenade sur l'évolution de la glycémie chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique.

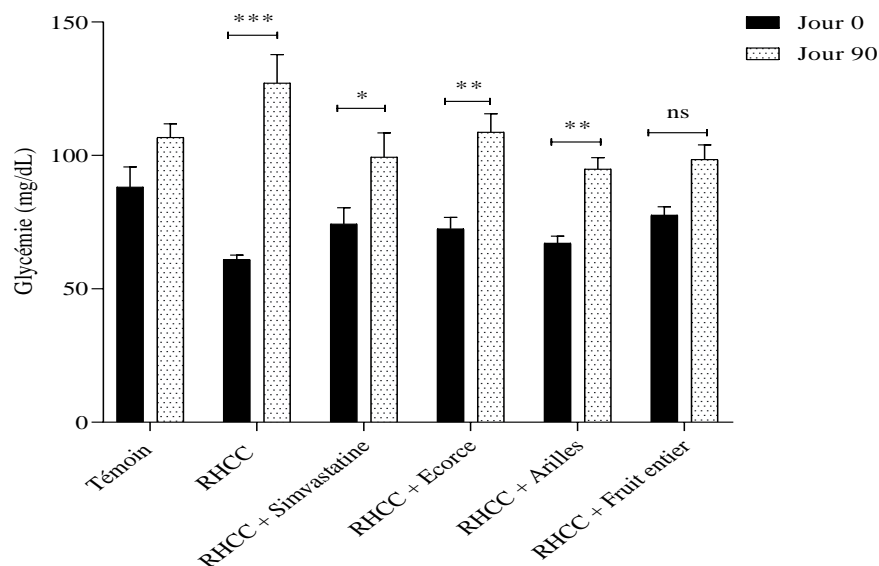


Figure 60: Effet des extraits phénoliques de grenade sur la glycémie chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique.

Les données sont rapportées en tant que moyenne \pm sem pour 5 ou 8 rats par groupe. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ indique des différences significatives entre J0 et J90 pour chaque groupe. ns : non significatif.

2.3.1.2 Profil lipidique, stress oxydant et marqueurs de toxicité au niveau hépatique

Une augmentation significative des niveaux des transaminases hépatiques ALAT et ASAT a été observée chez les animaux du groupe soumis un régime hypercalorique RHCC par rapport aux groupes traités par des extraits de grenade et le groupe témoin ($p < 0.001$, **Figure 61**), confirmant l'induction de dommages au niveau hépatique lors de l'alimentation

avec le régime RHCC. Cependant, le traitement avec la simvastatine et les extraits phénoliques de la grenade a réduit significativement les niveaux d'ASAT, et d'ALAT par rapport au groupe RHCC ($p < 0.001$, **Figure 61**).

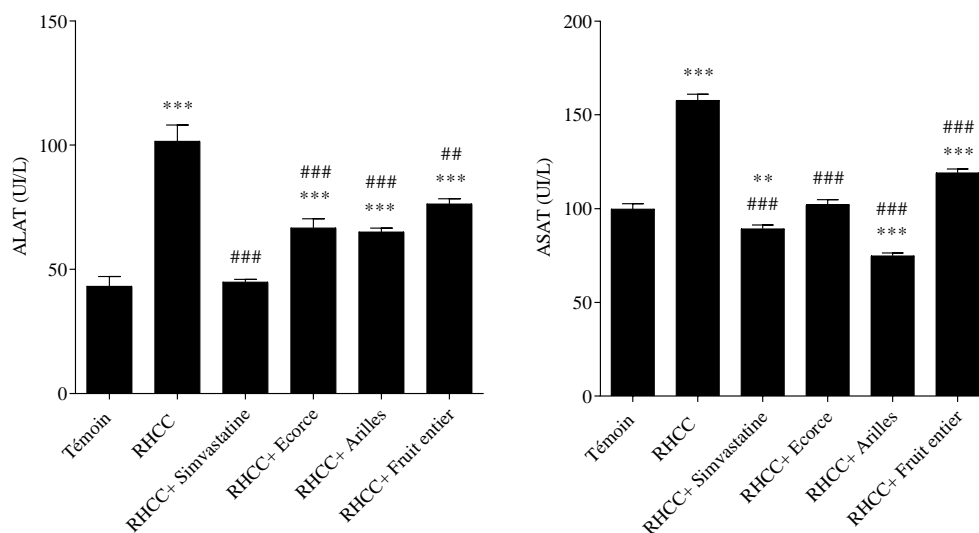


Figure 61: Effet des extraits phénoliques de grenade sur les enzymes hépatiques (ALAT et ASAT) chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique.

Chaque résultat représente la moyenne \pm sem pour 6 ou 8 rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ (comparé au groupe témoin), et # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, et ### $p < 0.001$ (comparé au groupe RHCC) représentent des différences significatives (tes-t de Student).

Sur le plan des lipides hépatiques, l'administration aux rats des extraits phénoliques de grenade a provoqué une réduction significative du taux de cholestérol total par rapport aux rats du groupe RHCC ($p < 0,001$, **Figure 62 A**). Fait intéressant, cette réduction a permis d'atteindre des niveaux similaires à ceux enregistrés chez le groupe témoin, ce qui témoigne de l'efficacité des extraits phénoliques de grenade. De plus, le taux de cholestérol total chez les rats ayant reçu la simvastatine était significativement inférieur à ceux des rats du groupe RHCC. Pour les concentrations des triglycérides, les résultats obtenus ont montré une augmentation significative des triglycérides (TG) chez les rats du groupe RHCC par rapport aux rats du groupe témoin normal, et des groupes traités par l'extrait phénoliques de grenade ($p < 0.0001$, **Figure 62 B**). Les résultats ont également indiqué que la réduction des triglycérides dans les groupes traités par les extraits phénoliques de grenade était similaire à celle du groupe témoin. Le traitement avec l'extrait de grenade a réduit de manière significative les niveaux de triglycérides par rapport au groupe RHCC ($p < 0.001$, **Figure 72 B**).

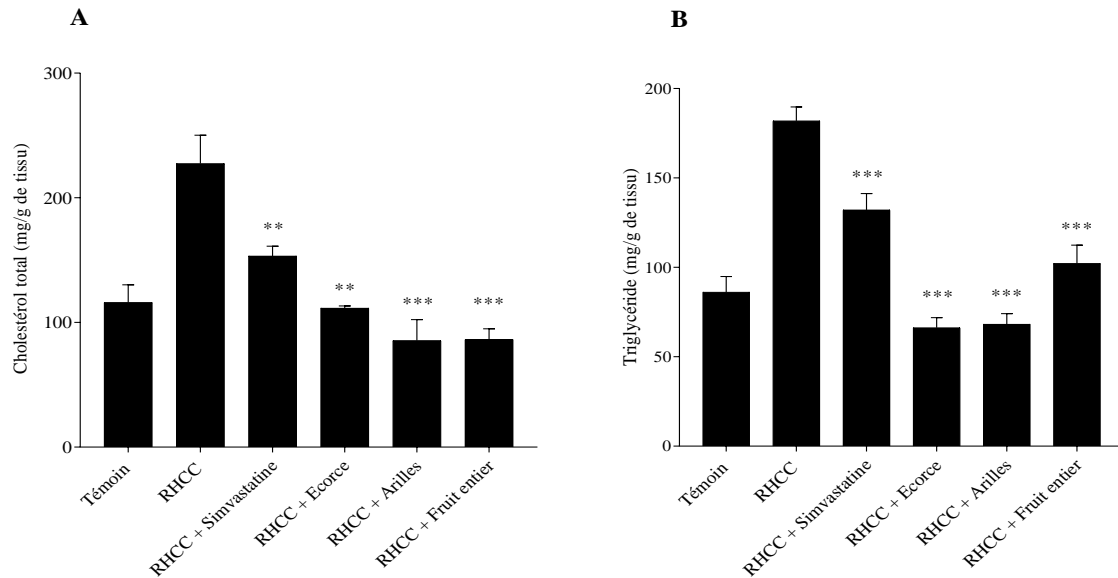


Figure 62: Effet des extraits phénoliques de grenade sur les lipides au niveau du foie chez des rats Wistar soumis à un régime hypercalorique RHCC. (A) Cholestérol total, (B) Triglycérides.

Chaque résultat représente la moyenne \pm sem pour 6 ou 8 rats. $**p < 0.01$, et $*** < 0.001$ représentent des différences significatives comparé au groupe RHCC (test de t).

Les paramètres du stress oxydant (dosage des TBARS) chez les rats hypercholestérolémiques après traitement par les extraits phénoliques de grenade sont présentés dans la **Figure 63**. Une augmentation significative du niveau de MDA a été observée au niveau hépatique des rats du groupe RHCC ($p < 0.001$, **Figure 63**). Les groupes traités avec les extraits phénoliques de grenade ont présenté des niveaux de MDA hépatiques relativement plus faibles mais significatives en comparaison avec le groupe RHCC ($p < 0.001$, **Figure 63**). L'activité antioxydante la plus forte a été enregistrée chez les rats du groupe simvastatine ($p < 0.001$) par rapport au groupe RHCC d'une manière significative. Il est intéressant de noter que l'effet antioxydatif des extraits de grenade « Sefri » était significativement comparable à celui du groupe témoin normal ($p < 0.05$, **Figure 63**). Il est important de noter que l'effet antioxydant des extraits phénoliques des arilles et de l'écorce était similaire et aucune différence significative n'a été observée (**Figure 63**).

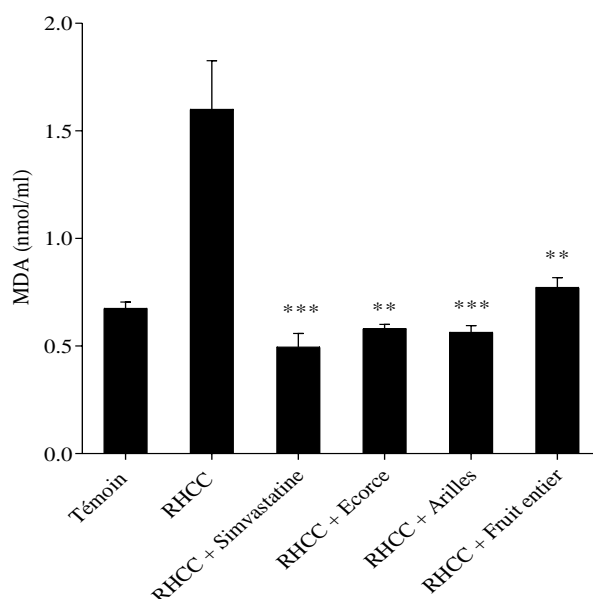


Figure 63: Effet des extraits phénoliques de grenade sur le stress oxydatif hépatique chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique.

Chaque résultat représente la moyenne \pm sem pour 6 ou 8 rats. **<0.01, et ***<0.001 représentent des différences significatives comparés au groupe RHCC (*t-test.*).

2.3.2 Étude histologique

2.3.2.1 Histologie du foie

L'analyse histologique du foie peut révéler la présence d'une dyslipidémie. C'est dans cette perspective qu'on a prélevé les foies des rats des différents lots pour effectuer une analyse histologique afin de confirmer l'efficacité des extraits phénoliques des arilles et de l'écorce de la grenade « Sefri » dans la protection contre l'effet du régime hypergras.

La coloration par l'hématoxyline/éosine a révélé dans la **Figure 64 a**, qui représente une coupe histologique du foie des rats du groupe témoin non traitée, une architecture normale du foie sans modification hépatique, les cellules mononuclées qui forment la classe dominante, avec la présence d'un nombre discret de cellules binucléées. La **Figure 64 b** qui représente la coupe histologique de foie des rats du groupe hyperlipidémique, montre un développement d'une stéatose hépatique en réponse au RHCC qui induit une diffusion massive des lipides à l'intérieur des hépatocytes ce qui permet une disposition intra hépatique de ces lipides sous forme de vacuoles. On distingue nettement un grand nombre des micros et macro gouttelettes lipidiques (en blanc) avec la disparition de leur noyau. On remarque aussi la présence de veines centro-lobulaires dilatées (**Figure 64**) l'une d'elle est congestive. La dilatation des sinusoides indiquées est un signe de toxicité. La **Figure 64 d** qui montre la coupe histologique

du foie des rats traitée par une dose de 250 mg/kg de l'extrait phénolique de l'écorce de *P. Granatum*. Cette figure nous permet d'observer un petit nombre de vacuoles lipidiques qui sont réparties dans les hépatocytes avec l'absence du noyau et une architecture presque normale. Ces observations signifient que cette dose a réduit le volume et le nombre des vacuoles lipidiques diminuant l'effet de la stéatose hépatique due au régime hypercalorique (RHCC). Dans les **Figures 64 e et f**, qui montre les coupes histologiques du foie des rats du groupe traité par l'extrait phénolique des arilles et du fruit entier, on note la disparition totale des gouttelettes lipidiques au niveau du foie des rats des deux lots ce qui indique l'absence totale de la stéatose hépatique.

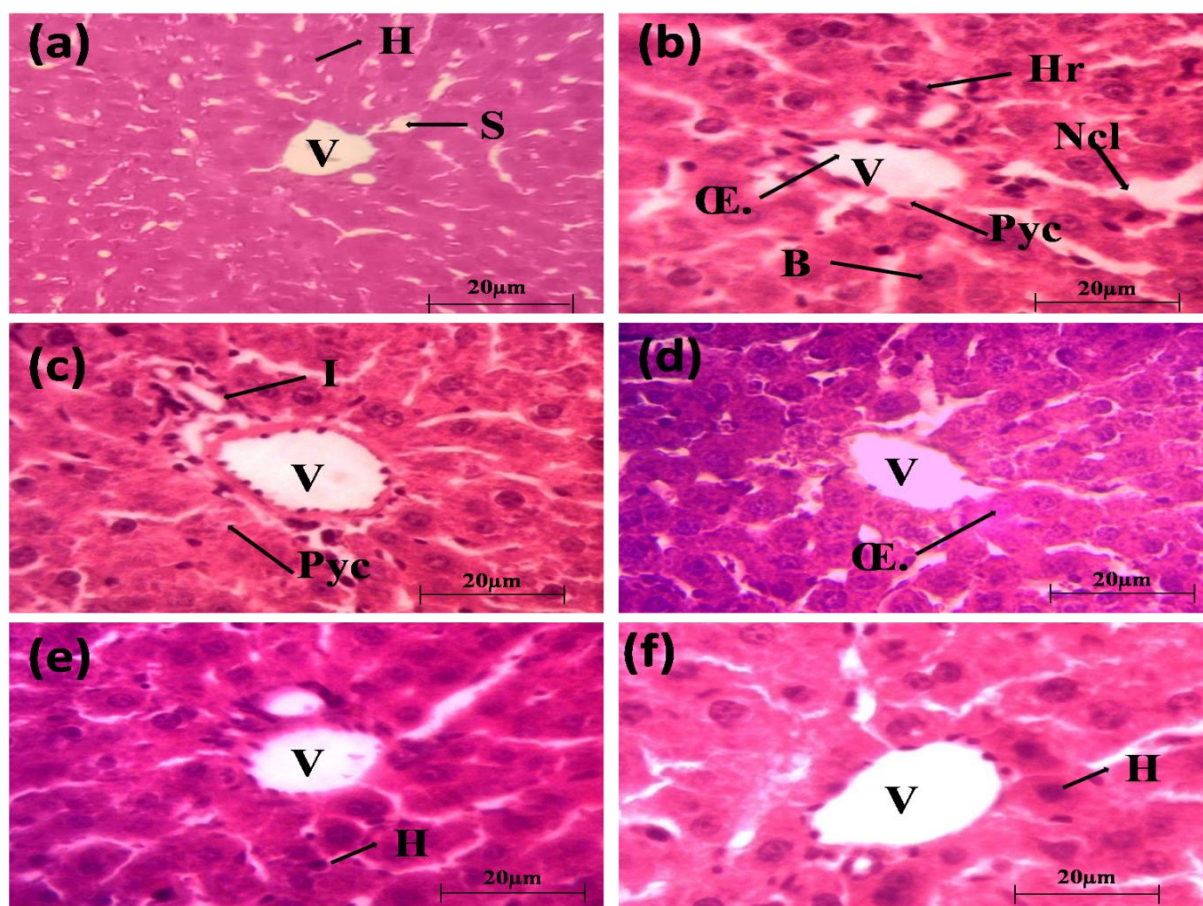


Figure 64: Coupes histologiques du foie du groupe témoin (a), du groupe sous RHCC (b), du groupe traité par l'extrait phénolique de l'écorce (c), du groupe traité par l'extrait phénolique des arilles (d), groupe traité par la simvastatine (e), et le groupe traité par l'extrait du fruit entier (f) (Gr x 400).

H : Hépatocytes, *V* : Veine centrale, *Hr* : Hémorragie, *Ncl* : Nécrose centro-lobulaire, *œ* : Oedème, *B* : Ballonisation, *I* : Infiltrat inflammatoire, *Pyc* : Pycnose, *S* : Sinusoïde.

2.3.2.2 Histologie de l'aorte

Comme le montre la **Figure 65**, les coupes de l'aorte de tous les animaux ont montré la structure normale de l'aorte et aucun signe de lésions athérosclérotiques n'a été observé. En outre, il n'y avait pas de différence dans la zone de la paroi aortique et l'épaisseur médiane de l'aorte entre les groupes expérimentaux.

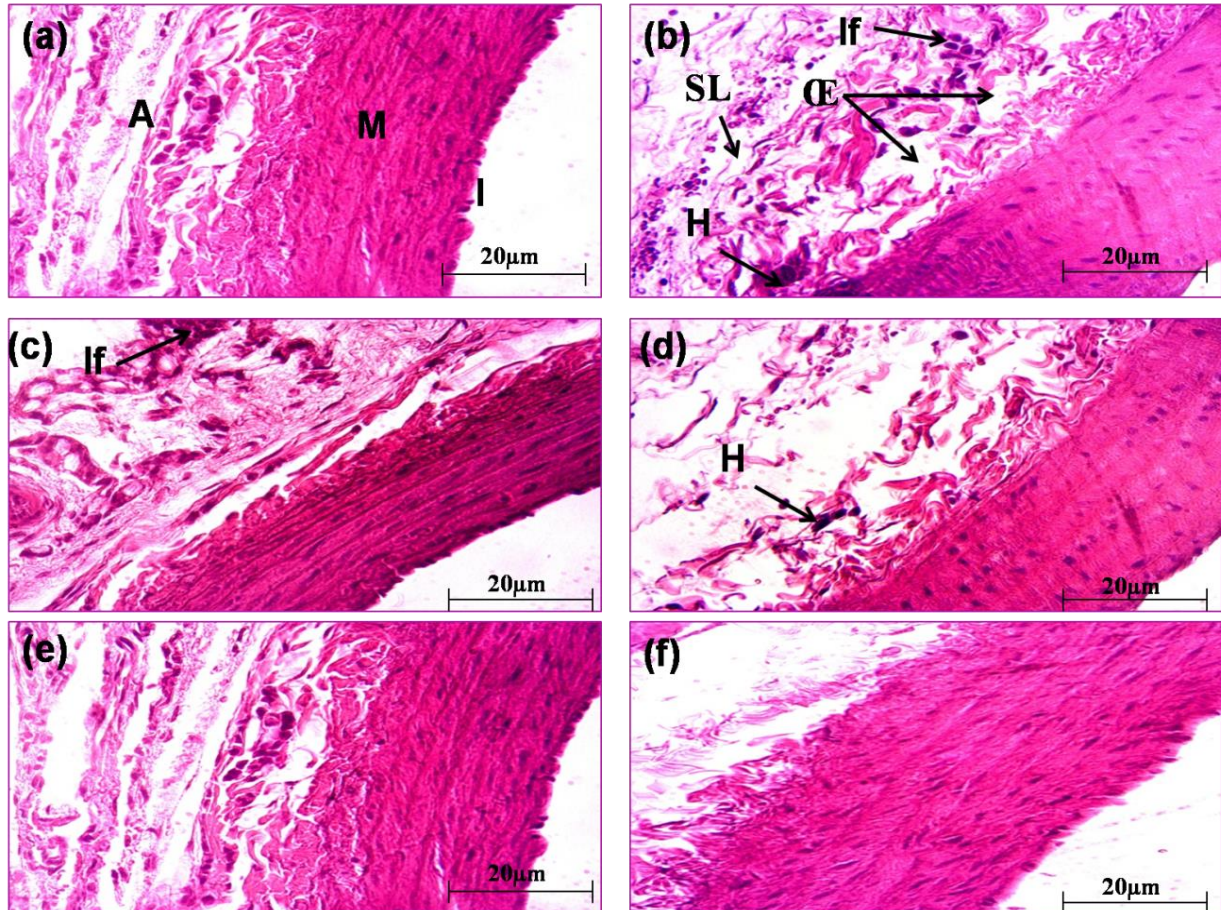


Figure 65: Coupes histologiques de l'aorte du groupe témoin (a), du groupe sous RHCC (b), du groupe traité par l'extrait phénolique de l'écorce (c), du groupe traité par l'extrait phénolique des arilles (d), du groupe traité par la simvastatine (e), et le groupe traité par l'extrait du fruit entier (f) (Gr x 400).

In : Intima, *M* : Média, *A* : Adventice, *H* : Hémorragie, *OE* : Œdème sous-endothélial, *If* : Inflammation, *SL* : Stries lipidiques.

3 Discussion

Les produits naturels, y compris les plantes médicinales, ont été utilisés dans la prévention et le traitement de base de différentes pathologies (Chaachouay et al., 2021). Les médicaments à base de plantes ont reçu une grande attention en tant qu'alternatives aux produits pharmaceutiques synthétiques ces derniers temps, ce qui a conduit à l'augmentation de leur demande (Mythilypriya et al., 2007). Cependant, il est important de vérifier la sécurité et l'efficacité des produits à base de plantes par une méthode de dépistage expérimentale, ainsi que d'établir les composants actifs de ces remèdes à base de plantes (Das et al., 2015). L'objectif principal de l'évaluation toxicologique de tout médicament à base de plantes est d'identifier les effets indésirables et de déterminer les limites du niveau d'exposition auquel ces effets se produisent. Deux facteurs importants qui sont pris en considération dans l'évaluation de la sécurité de tout médicament à base de plantes sont la nature et l'importance de l'effet indésirable. Les tests de toxicité peuvent révéler certains des risques qui peuvent être associés à l'utilisation de plantes médicinales, en particulier chez les populations sensibles.

Le premier volet de ce travail a été consacré à l'étude de la toxicité des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade « variété Sefri ». Le résultat du test de toxicité DL50 des extraits phénoliques a montré qu'un seul rat est mort dans le 14^{ème} jour d'exposition à une dose équivalente à 1,5 g/kg de poids corporel administrée par voie orale et 3 rats pour une dose de 2 g/Kg de poids corporel. Ce résultat indique que la mort survient à une dose systémique très élevée et qu'il s'agit d'un produit non toxique. Ceci est en accord avec Bhandary et al. (Bhandary et al., 2013) qui ont également déclaré que l'extrait alcoolique du fruit entier de la grenade et de ses graines ainsi que l'acide ellagique sont pratiquement non toxiques lors de l'administration orale d'une dose unique chez les souris (2 g/Kg). Aucune mortalité n'a été observée à la fin de la période de 24 heures et la DL50 était supérieure à 2 g/Kg. L'ingestion des parties comestibles de la grenade et de ses extraits est considérée comme non toxique. Il a aussi été rapporté qu'un extrait de fruit de grenade, administré par voie orale, dans une étude de toxicité aiguë, avait une DL50 de plus de 5g/kg chez les rats *Wistar* et les souris *Swiss albinos* et que dans l'étude sub-chronique tous les animaux ont survécu et aucun changement dans les paramètres cliniques (physiques et comportementaux) n'a été observé (Patel et al., 2008). Dans une autre étude, le résultat de la toxicité aiguë orale (OCDE 2001), n'a révélé aucun signe de toxicité dans un extrait d'écorce à une dose unique fixe de 2g/kg pendant 14 jours (El Deeb et al., 2021). De plus, la fraction de l'extrait

méthanolique de l'écorce de grenade a été évaluée lors d'un test de toxicité aiguë et s'est avérée sans danger à une dose supérieure à 5g/kg (Gautam et al., 2018). Wei et al. (Wei et al., 2020) ont évalué la toxicité aiguë de l'extrait éthanolique de l'écorce chez la souris après administration par voie orale de l'extrait à une dose croissante jusqu'à 5g/Kg de poids corporel. Toutes les souris ont été observées individuellement pour la mortalité et les changements de comportement pendant 14 jours. Aucun signe de mortalité ni d'anomalie de conditions générales n'ont été observés chez ces souris. De plus, aucune anomalie n'a été observée au niveau du cœur, du foie, de l'estomac, de la rate, des poumons, des reins et d'autres organes principaux. Cependant, certains extraits d'autres parties peuvent avoir des effets toxiques à des doses élevées en raison de leur forte teneur en alcaloïdes et en tannins (Guerrero-Solano et al., 2020). La partie du grenadier peut également influencer le degré de toxicité, par exemple, il a été constaté que la DL50 de l'extrait de l'écorce (administration intrapéritonéale de deux variétés marocaine Sefri et Amrouz) est de 320, 5-355, 8 mg/kg chez les rats *Wistar* et de 300-348,2 mg/kg chez les souris *albinos*, respectivement (Ouachrif et al., 2012). Vidal et al. (Vidal et al., 2003) ont trouvé que la DL50 d'un extrait hydro-alcoolique de fruit entier de grenade administré par voie intra-péritonéale à des souris était de 731,1 mg/kg et ont trouvé qu'il y avait embryotoxique à une dose supérieure à 100 mg/kg. Il a également été rapporté que les punicalagines (un tanin abondant dans la grenade), ont un effet cytotoxique sur les lignées cellulaires, à des concentrations élevées (Kulkarni et al., 2007). Cependant, Cerdá et al. (Cerdá et al., 2003) ont mené un essai dans lequel ils ont conclu que l'administration orale de fortes doses (un régime commercial contenant 0, 5, 2, 5, 10 et 20 % d'extrait d'écorce) de punicalagine provenant des élagitanins de grenade à des rats *Wistar* pendant 37 jours n'est pas toxique, et ont renforcé cette conclusion par une étude histopathologique du foie et des reins.

L'étude de l'activité hypolipimiant des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri » a montré des résultats significatifs vis-à-vis de l'effet préventif contre l'hyperlipidémie induite par le Triton WR-1339- chez les rats *Wistar*. Une dose orale unique (250 mg/kg) des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri » a été capable de prévenir l'augmentation des niveaux de cholestérol total, de cholestérol LDL, VLDL et des triglycérides, en plus elle a été capable de prévenir la diminution des niveaux de cholestérol HDL induite par l'administration de Triton WR 1339. De plus, nous avons observé un effet protecteur de la grenade « Sefri » contre le stress oxydant, en réduisant l'altération des niveaux de peroxydation lipidique induite par le Triton WR-1339.

Dans la présente étude, nous avons observé une augmentation des taux de cholestérol total, de cholestérol LDL et de triglycérides et une diminution des taux de cholestérol HDL, 24 heures après une injection unique de Triton WR-1339 chez les rats (300 mg/Kg). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres études (Abdou et al., 2018; Bouhlali et al., 2020; Harnafi et al., 2018). Plusieurs études ont montré que l'administration systémique de Triton WR-1339 à des rats et des souris à jeun, entraîne une augmentation du taux de lipides dans le plasma (Abdou et al., 2018; Bouhlali et al., 2020; Gayathri et al., 2013; Harnafi et al., 2018; Vijayaraj et al., 2013). Au début, il y a une forte augmentation du taux de lipides qui atteint un pic de deux à trois fois la valeur de contrôle 24 h après l'injection de Triton WR-1339, phase I (phase de synthèse), ce qui tombe dans l'hyperlipidémie 24 h ou 48 h après l'administration de Triton WR-1339, phase II (phase d'élimination) (Sikarwar & Patil, 2012).

Le Triton WR-1339, a été largement utilisé pour bloquer l'absorption des lipoprotéines riches en triacylglycérols du plasma par les tissus périphériques afin de produire une hyperlipidémie aiguë chez des modèles animaux, qui sont souvent utilisés pour un certain nombre d'objectifs, en particulier pour le criblage de médicaments hypolipidémiques naturels ou chimiques (Harnafi et al., 2008; Touiss et al., 2017). Des études expérimentales soutiennent le concept selon lequel le Triton WR-1339 provoque une altération au niveau des lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les rendant sensibles à l'action des enzymes lipolytiques du sang et des tissus (Friedman & Boyers, 1953). Ceci empêche ou retarde leur élimination du sang et stimule la biosynthèse hépatique du cholestérol, provoquant une hyperlipidémie (Goldfarb, 1978).

Nos résultats sont aussi en accord avec d'autres études impliquant le profil anti-hyperlipidémique de la grenade ont été réalisées chez la souris. Harnafi et al. (2018) ont démontré que le traitement avec l'extrait aqueux de l'écorce de la grenade « Sefri », à la dose de 500 mg/kg chez les souris, était efficace pour diminuer le cholestérol total, les triglycérides, le cholestérol LDL et le cholestérol VLDL et augmenter les niveaux de cholestérol HDL dans un modèle d'hyperlipidémie induite par le Triton WR 1339 à une dose de 200 mg/Kg de poids corporel (Harnafi et al., 2018). De plus, des doses plus élevées de l'écorce de grenade (50, 100, 200 et 300 mg/Kg) ont entraîné une diminution significative du profil lipidique avec une augmentation de la concentration du cholestérol HDL après 23 jours du traitement chez des rats soumis à une régime hypercalorique (Sadeghipour et al., 2014).

Ces résultats sont d'une grande importance car les composés phénoliques de la grenade sont considérés comme des composants importants des « aliments fonctionnels », qui peuvent

prévenir l'athérosclérose et par la suite l'apparition des maladies cardiovasculaires (Benchagra et al., 2021). En outre, certains patients sous traitement par statines ne tolèrent pas bien les statines ou n'atteignent pas l'objectif de taux de cholestérol à lipoprotéines de basse densité (C-LDL) recommandé par les directives de l'Institut National de Santé « National Institutes of Health guidelines » (Lenfant et al., 2001). Par conséquent, il est souhaitable de développer des médicaments naturels qui possèdent un effet hypocholestérolémiant comparable à celui des statines, mais qui pourraient être bien tolérés par les patients.

Un point important dans ce travail est que la grenade a eu un meilleur effet que la simvastatine pour réduire les niveaux de lipides plasmatiques, principalement les triglycérides. Une explication possible de l'action hypolipidémique de la grenade est liée à l'activité de l'HMG-CoA réductase, mécanisme similaire à celui des statines, une autre hypothèse est liée à l'activité de la lipoprotéine lipase, responsable de la diminution des niveaux de triglycérides plasmatiques. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour identifier les mécanismes de la grenade dans ce modèle d'hyperlipidémie. Par conséquent, nos résultats suggèrent que la supplémentation en grenade peut être utilisée comme un adjuvant dans le traitement des dyslipidémies.

Sachant que la grenade a un effet antioxydant et que sa propriété importante qui peut inhiber l'hyperlipidémie est sa capacité antioxydante, nous avons cherché à savoir si l'hyperlipidémie aiguë induite par le Triton WR-1339 chez les rats *Wistar* modifiait certains paramètres de stress oxydatifs dans le plasma et si l'effet antioxydant de la grenade était lié à ce processus. Dans notre étude, le Triton WR-1339 administré à des rats a été capable d'augmenter le marqueur de stress oxydatif TBARS. Stokes et al. (Stokes et al., 2002) ont signalé que les niveaux de ROS dans l'hypercholestérolémie étaient plus élevés que dans l'état normal. En accord avec cela, Harnafi et al. (2018), ont trouvé que 10 h après l'administration de Triton WR-1339 à des souris, le niveau de TBARS plasmatique était augmenté par rapport au groupe témoin (Harnafi et al., 2018). Ainsi, dans cette présente étude, le marqueur du stress oxydatif dans le plasma a été modifié chez les rats traités au Triton WR-1339. Les radicaux libres d'oxygène ou, plus généralement, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), sont les produits d'événements métaboliques normaux et de transduction du signal à l'intérieur d'une cellule, mais l'oxydation des radicaux libres est responsable de la dégradation des acides gras et de leurs esters dans les membranes biologiques et les lipoprotéines (Morgan et al., 2007), par conséquent, cette oxydation peut également jouer un rôle dans les processus pathologiques.

Le fruit de grenade a empêché l'altération des marqueurs du stress oxydatif, il a diminué de manière significative le niveau de TBARS dans le plasma modifié par le Triton WR-1339. Ces résultats démontrent l'action antioxydante de la grenade dans ce modèle et suggèrent cet effet comme un mécanisme possible de l'effet hypolipidémique de la grenade.

Suite à l'étude de l'effet hypolipémiant de la grenade vis-à-vis de l'hyperlipidémie aiguë induite par le Triton WR 1339, nous avons conduit une étude sur un modèle chronique d'hyperlipidémie induite par un régime RHCC dans le but d'étudier l'effet antiathérogène de la grenade et d'en déterminer les mécanismes d'action. Les résultats obtenus dans notre étude, ont montré que la consommation d'un régime riche en graisses et en cholestérol a entraîné une augmentation significative ($p < 0.001$) du poids corporel chez les rats du groupe (RHCC seule) par rapport au groupe témoin normal (régime standard) tout au long de la période expérimentale de 12 semaines. Ces résultats ont confirmé la proposition selon laquelle l'exposition chronique à un régime riche en graisses entraîne des états d'obésité qui sont liés à une altération à la hausse du bilan énergétique (Lennox et al., 2015). Cela pourrait être dû au taux élevé d'acylation des acides gras saturés en triglycérides qui sont ensuite stockés dans le tissu adipeux et au niveau des viscères, d'où la prise de poids (Storlien et al., 2001). De plus, les effets post ingestion des régimes riches en graisses contribuent à la prise de poids par la réduction des signaux de satiété (leptine, cholécystokinine et peptide YY) (Little et al., 2007).

Plusieurs études, menées sur des sujets humains, ont montré qu'une consommation élevée de graisses conduit à l'obésité et à d'autres maladies métaboliques associées, qui constituent le principal facteur de risque de morbidité et de mortalité (Bais et al., 2014). Dans le présent travail, le régime enrichi en graisses et en cholestérol a provoqué une augmentation significative du poids corporel, des indices d'athérogénicités et des concentrations sériques et hépatiques de cholestérol total et de triglycéride chez les rats. Les extraits phénoliques de grenade « Sefri » ont montré un effet protecteur contre l'hyperlipidémie induite par le régime hypercalorique. En effet, nos résultats montrent une réduction significative ($p < 0,001$) des taux de (TG, CT, C-LDL, et C-VLDL) et une augmentation des niveaux de C-HDL. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Binmowyna et al. (Binmowyna et al., 2020) qui ont constaté que l'administration d'un extrait aqueux de graines et le jus de deux variétés de grenade de l'Égypte et de l'Arabie Saoudite pendant 60 jours chez des rats rendus obèses par un régime hypercalorique est capable de changer le profil lipidique en augmentant le niveau du C-HDL et en diminuant les niveaux de CT, TG, C-VLDL et C-LDL. De plus, Sadeghi et al. (Sadeghipour et al., 2014) ont montré que l'administration d'un extrait hydro-

éthanolique de l'écorce d'une variété iranienne à différentes doses (50, 100, 200 et 300 mg/Kg de poids corporel) chez des rats sous un régime hypercalorique pendant 23 jours, à diminué d'une manière significative le poids corporel et le profil lipidique avec une augmentation significative de la concentration du cholestérol HDL. De plus, notre étude suggère que la supplémentation en extraits de grenade était capable de prévenir l'augmentation du poids corporel.

Cet effet peut être dû à la capacité des composés bioactifs de grenade à inhiber l'absorption intestinale des lipides alimentaires. Cela entraîne une diminution du transport du cholestérol intestinal vers le foie, ce qui conduit à une réduction des réserves de cholestérol hépatique et à une augmentation de la clairance du cholestérol dans le sang. En général, les hypolipidémisants agissent principalement en diminuant les niveaux de cholestérol, soit en réduisant son absorption intestinale, soit en stimulant la décomposition du cholestérol en bile dans le foie, en régulant plusieurs facteurs de transcription et transporteurs, à savoir LXR α , RXR α , PPAR α , PPAR γ , SR-B1, ABCG1 et le transporteur ABCA1 (Liu et al., 2015). Cela peut expliquer les réductions du taux du cholestérol total, des TG et du C-LDL dans le sérum des rats nourris au régime hypercalorique. D'autre part, nos résultats sont en accord avec plusieurs études selon lesquels le jus, l'écorce et les graines de grenade ont des effets hypolipidémiques puissants lors d'une alimentation riche en graisses (Binmowyna et al., 2020; Sadeghipour et al., 2014). De plus, les huiles de graines de grenade ont significativement diminué le cholestérol total, les TG et du C-LDL et augmenté le C-HDL chez des rats hypercholestérolémiques (Elbandy & Ashoush, 2012). De plus, au niveau des études in vitro sur des macrophages isolés, le jus de grenade a réduit significativement l'absorption des LDL oxydées (Park et al., 2011). Chez des sujet sains, la consommation régulière de grenades a réduit de manière significative l'accumulation des LDL, qui constituent une étape initiale de la formation des cellules spumeuses et l'apparition de l'athérosclérose (Kaplan et al., 2001). En outre, chez des patients diabétiques souffrant d'hyperlipidémie, la consommation de jus de grenade concentré pendant 8 semaines a réduit de manière significative le taux sérique de cholestérol total, C-LDL et le rapport C-LDL/C-HDL, en revanche aucun effet n'a été observé sur le taux sérique de C-HDL (Esmailzadeh et al., 2006).

L'indice d'athérogénicité (AI) est connu comme étant un marqueur pour prévenir le risque de dyslipidémie athérogène et de maladies coronariennes (Duraipandiyar et al., 2016). La capacité des extraits de grenade à augmenter le taux du C-HDL et à diminuer le taux du

CT sérique et hépatique et le C-LDL, suggère que ces extraits possèdent un puissant effet antiathérogène et pourraient prévenir les maladies cardiovasculaires. En outre, la modification oxydative des LDL, facilite leur absorption par les macrophages conduisant ainsi à la formation de cellules spumeuses dans la paroi des vaisseaux, appartenant aux changements précoces qui initient la formation de la plaque d'athérome (Alissa & Ferns, 2017). En outre, Aviram et al. (Michael Aviram et al., 2000) ont démontré que le jus de grenade a augmentait l'activité sérique de la paraoxonase (PON1) dans les groupes hypercholestérolémiques traités. Il a été signalé que cette enzyme protège les LDL contre l'oxydation, inverse les effets biologiques du LDLs oxydées et préserve la fonction des HDLs en inhibant leur oxydation (Ng et al., 2005). Ces données suggèrent que la grenade pourrait protéger contre l'athérosclérose chez le modèle animal.

Un régime hypercalorique provoque une production anormale de radicaux libres d'oxygènes, qui augmente par la suite le processus de peroxydation des lipides, entraînant la formation de malondialdéhyde MDA et accélérant le développement et la progression de l'athérogenèse (Oh et al., 2006). Par conséquent, l'inhibition de la peroxydation lipidique peut être l'un des moyens les plus efficaces pour prévenir l'athérosclérose. Les deux extraits de grenade ont montré un puissant effet d'inhibition de la peroxydation lipidique lors de l'évaluation de la concentration du MDA chez les soumis à un régime hypercalorique. Comme indiqué dans notre étude, ces extraits de grenade ont montré une forte capacité de piégeage des radicaux DPPH, H₂O₂ et ABTS et ont une excellente activité chélatrice contre les ions ferreux (Benchagra et al., 2021).

Bien que la simvastatine ait montré un effet hypolipémiant significatif dans cette étude, les personnes souffrant d'hyperglycémie et d'hypertension artérielle ne parviennent pas à atteindre les niveaux normaux souhaités de CT, TG, C-LDL et C-HDL avec une monothérapie par la statine seule (Cai et al., 2017). De plus, 10 à 20% des personnes ont développé une intolérance aux statines surtout à des doses élevées (Banach et al., 2015), et plus de 40% des personnes ayant des taux sériques élevés de lipides sont interdites d'utiliser cette thérapie en raison de ses effets secondaires (Cai et al., 2017). Par conséquent, ces extraits de grenade pourraient être considérés comme une alternative ou une thérapie complémentaire aux statines, sachant qu'ils ont également des propriétés hypolipémiantes significatives, notamment anti-inflammatoires et antioxydantes (Benchagra et al., 2021).

Selon l'analyse histologique du foie des rats traités par les extraits phénoliques des arilles et de l'écorce de la grenade « Sefri » pour la dose de 250 mg/Kg, on remarque que ces deux

extraits diminuent la stéatose hépatique par la diminution remarquable des vacuoles lipidiques, agissant ainsi comme des anti-hyperlipidémisants ce qui confirme notre étude biochimique. Les extraits phénoliques ont restitué l'architecture normale du foie mais présentent des signes de toxicité (les veines centro-lobulaires dilatées ou la dilatation des sinusoides), en particulier dans le cas de l'extrait de l'écorce. Cependant, la dilatation des veines centro-lobulaires est limitée puisque dans la plupart des cas elles n'étaient pas congestives.

Les foies obtenus à partir du groupe ayant subi un régime hypercalorique (RHHC) dans cette étude présentaient des foies jaunâtres, hypertrophiés et largement infiltrés de taches jaunes à l'examen macroscopique. Ces taches jaunes peuvent être dues à un dépôt de graisse à l'intérieur des cellules hépatiques, ce qui peut être attribué à une dilatation sinusoidale, une stéatose microvésiculaire ou une fibrose résultant d'une augmentation du tissu conjonctif suite à une nécrose hépatocellulaire (Altunkaynak & Ozbek, 2009). La perturbation de l'architecture hépatique du foie observée dans cette étude a été expliquée comme le résultat de dommages oxydatifs dans les protéines hépatocellulaires ou de changements nécrotiques dans les hépatocytes qui conduisent à une irrégularité dans l'orientation des hépatocytes et à une perturbation de l'architecture hépatique (Abraham et al., 2002). La dilatation des veines centrales, des sinusoides sanguins et des veines portales a été attribuée à des modifications inflammatoires ou à une ischémie et une hypoxie consécutives à un régime riche en graisses (Arvanitidis et al., 2009). La dilatation pourrait également être due au développement d'une hypertension après une obésité induite par un régime riche en graisses (Elahi et al., 2009).

Dans le présent travail, il a été observé que l'administration quotidienne des extraits phénoliques de grenade, avec un régime riche en graisses (RHCC), améliore les changements précédents. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'autres chercheurs (Al-shaabi et al., 2016; Hassan et al., 2018). A cet égard, il a été rapporté que le jus de grenade avait un effet protecteur contre les dommages hépatiques induits par le tétrachlorure de carbone chez les rats (Abdel et al., 2016), cet effet pourrait être attribué aux constituants antioxydants piégeant les radicaux libres. Les principaux polyphénols antioxydants présents dans le fruit de grenade comprennent les ellagitannins, les anthocyanins, la punicalagine α et β qui se sont avérés être les antioxydants responsables de l'élimination des radicaux libres (Benchagra et al., 2021). En outre, l'effet antioxydant des flavonoïdes présents dans la grenade a renforcé le processus de régénération ; cela pourrait être dû à la destruction des radicaux libres, à la fourniture d'un substrat compétitif pour les lipides insaturés dans la membrane et/ou à

l'accélération du mécanisme de réparation des membranes cellulaires endommagées (Pirinccioglu et al., 2014).

4 Conclusion et perspectives

Les résultats de la présente étude ont démontré que les extraits de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri », ont un effet hypolipémiant puisqu'ils ont empêché l'augmentation des taux de TG, CT, c-VLDL et c-LDL dans le plasma et le foie des rats ayant subi un régime hypercalorique RHCC et une hyperlipidémie induite par le Triton WR-1339, en revanche la concentration du cholestérol HDL a connu une augmentation significative. En outre, les deux extraits de grenade avaient une concentration élevée d'acide gallique, acide ellagique, α et β punicalagine et présentaient une activité antioxydante marquée. Par conséquent, nos résultats suggèrent que la supplémentation en extraits de grenade « Sefri » pourrait être utilisée comme traitement non-thérapeutique des maladies cardiovasculaires. D'autres études sont en cours pour déterminer les composés actifs et expliquer le mécanisme d'action possible de cet effet hypolipémiant aux niveaux moléculaire et cellulaire.

Chapitre III : Activité des extraits phénoliques de la grenade Sefri (*Punica granatum* L.) riches en punicalagine sur le processus oxydatif et le transport inverse du cholestérol

1 Introduction

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS) endommagent le fonctionnement cellulaire des lipides, des protéines et des glucides, et provoquent la peroxydation des lipides et l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Akhigbe & Ajayi, 2021; Juan et al., 2021). Les LDL oxydées (ox-LDL) peuvent rester dans l'intima vasculaire, et sont considérées comme la première cause de l'initiation et le développement de l'athérosclérose (Poznyak et al., 2021).

La formation de cellules spumeuses dérivées des macrophages, est l'une des caractéristiques pathologiques, typique de l'athérosclérose précoce (Basatemur et al., 2019; Williams et al., 2020; Zheng et al., 2021). Par conséquent, il est important de prévenir ou d'inverser la formation de ces cellules pour prévenir et traiter l'athérosclérose, ce qui peut être réalisé en réduisant l'oxydation des lipoprotéines, en limitant l'excès de cholestérol et en favorisant l'efflux de cholestérol intracellulaire des macrophages (Aviram et al., 2005).

Le transport inverse du cholestérol est le seul moyen pour éliminer l'excès de cholestérol (Adorni et al., 2021; Kontush, 2020; Nakaya et al., 2017; Ouimet et al., 2019; Trajkovska & Topuzovska, 2017; Uribe et al., 2021). L'efflux de cholestérol est l'étape la plus importante du transport inverse du cholestérol des macrophages, par laquelle le cholestérol intracellulaire des macrophages est transféré vers des accepteurs extracellulaires tels que les lipoprotéines de haute densité (HDL) (Adorni et al., 2021; Ouimet et al., 2019). Le transporteur ABCA1 assure l'efflux de cholestérol et de phospholipides vers l'apolipoprotéine A-1 pauvre en lipides participant ainsi à la formation des HDL (Adorni et al., 2021; Ouimet et al., 2019; Rosenson et al., 2012). Les transporteurs ABCG1 assurent la médiation de l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL matures (Adorni et al., 2021; Ouimet et al., 2019). Le récepteur hépatique alpha LXR α et le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR γ) sont des gènes essentiels qui participent à la régulation d'ABCA1 et ABCG1 (Zheng et al., 2021). Les études ont montré que la voie de signalisation des récepteurs nucléaires PPAR/LXR α /ABCA1/ABCG1 est essentielle pour comprendre la régulation du métabolisme lipidique (Gao et al., 2020; Song et al., 2021; Zhao et al., 2016; Zheng et al., 2021).

Les antioxydants naturels constituent une première ligne de défense contre la peroxydation des lipides dans les lipoprotéines et dans les cellules artérielles, y compris les

cellules spumeuses des macrophages (Aviram et al., 2005). Une deuxième ligne de défense par les antioxydants pourrait être liée à la stimulation des paraoxonases (PON) (Aviram et al., 2005). La PON1 est associée dans le sérum aux lipoprotéines de haute densité (HDL) (Levy et al., 2019; Wysocka & Zwolak, 2021). Il a été démontré que l'activité de la PON1 sérique est inversement associée au risque de développement de l'athérosclérose et ce phénomène pourrait être lié à la capacité de la PON 1 à protéger les LDL, HDL et les cellules artérielles contre l'oxydation, grâce à son action hydrolytique sur des lipides oxydés spécifiques (Aviram et al., 2005; Levy et al., 2019). Il a été démontré aussi que la PON1 joue un rôle capital dans la protection contre le stress oxydant et le développement des maladies cardiovasculaires (Ikhlef et al., 2017).

L'écorce, les graines, le jus et les arilles de grenade sont considérés comme une source riche en composés phénoliques possédant des propriétés nutritionnelles, antioxydantes et autres propriétés bénéfiques (Di Stefano et al., 2019; Russo et al., 2018; Sabraoui et al., 2020). L'écorce de grenade possède une teneur plus élevée en polyphénols que les graines et le jus (Faria & Conceição, 2011). Ces polyphénols comprennent la punicalagine, qui présente une forte activité antioxydante. L'écorce de grenade est connue pour ses propriétés curatives en ce qui concerne les maladies inflammatoires, le diabète, l'athérosclérose, le stress oxydant, le cancer et les infections microbiennes (Ismail et al., 2012; Kalaycioğlu & Erim, 2017; Kojadinovic et al., 2017; Razani et al., 2017; Song et al., 2016; Turrini et al., 2015).

Dans la présente étude, nous avons émis l'hypothèse que les extraits phénoliques de la grenade « Sefri » réduisaient l'accumulation du cholestérol en diminuant l'apport en cholestérol et en favorisant l'efflux du cholestérol. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué leurs propriétés bénéfiques, en particulier leur rôle dans la prévention de la peroxydation lipidique des LDL humaines et des cellules cancéreuses de la vessie humaine J82 et la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Nous avons également étudié l'effet des extraits sur l'activité de la paraxonase (PON1), qui joue un rôle capital dans la prévention de l'athérosclérose. De plus, nous avons étudié leurs effets sur l'accumulation et l'efflux du cholestérol cellulaire dans les macrophages J774, et on a révélé les mécanismes moléculaires sous-jacents.

2 Résultats

2.1 Effet de la grenade sur l'oxydation des LDL et l'activité de la PON1

Pour mieux comprendre le mécanisme antioxydant des extraits riches en composés phénoliques de la grenade « Sefri », nous avons analysé la capacité de l'écorce et des arilles à

inhiber l'oxydation des LDL induite par le cuivre, à empêcher la disparition de la vitamine E (α -tocophérol) et à favoriser l'activité de la paroxonase PON1. Les résultats de l'oxydation des LDL induite par le cuivre (ox-LDL) ont montré que les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles ont inhibé la formation des diènes conjugués d'une manière significative ($P < 0,0001$), l'extrait de l'écorce étant le plus efficace que l'extrait des arilles (0.154 ± 0.0017 et 0.167 ± 0.002 , $P = 0,011$, respectivement). Cet effet a été confirmé en mesurant la teneur en α tocophérol des LDL oxydées en présence ou en absence des extraits phénoliques du grenadier. Comme l'indique la **Figure 66**, l'oxydation des LDL seules a augmenté le taux de disparition de l' α -tocophérol après 4 h d'oxydation (3.29 ± 0.04 et $2.21 \pm 0.06 \mu\text{M}$, $p < 0,001$, pour les LDL non oxydées et les LDL oxydées, respectivement). Cependant, les extraits phénoliques de la grenade ont significativement empêché la dégradation de l' α -tocophérol. Les résultats de la **Figure 76** montrent aussi que l'écorce présente un effet plus puissant que l'extrait des arilles ($3.28 \pm 0.12 \mu\text{M}$, $p < 0,01$, et $2.81 \pm 0.17 \mu\text{M}$, $p < 0,05$, respectivement, par rapport aux valeurs des LDL oxydées).

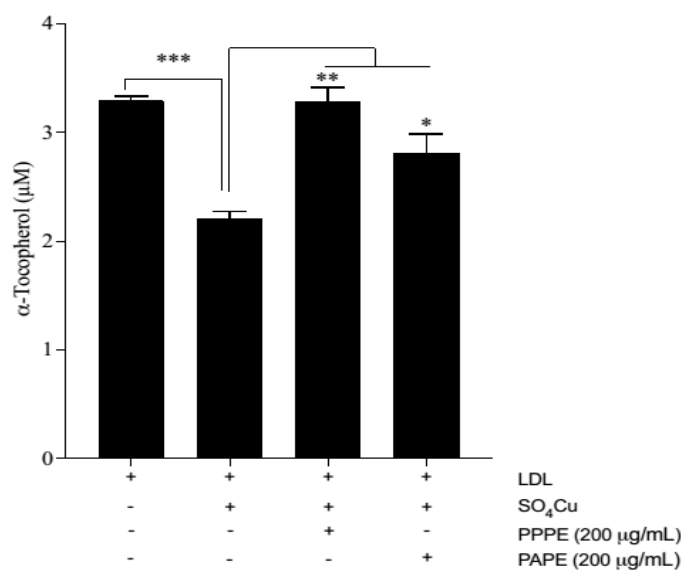


Figure 66: Effet des extraits phénoliques de la grenade sur la disparition de l' α tocophérol endogène après 4 h d'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) induite par le CuSO_4 .

Chaque résultat représente la moyenne \pm sem pour au moins trois essais indépendants. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle.

L'activité de la PON1 a été évaluée en présence ou en absence des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri ». La PON1, une estérase associée aux HDL, hydrolyse les lipides oxydés, qui sont inactivés en cas de stress oxydatif. L'incubation du plasma humain avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de l'extrait de l'écorce ou bien des arilles pendant 4 h à une

température de 37 °C a montré que les extraits de la grenade « Sefri » augmentent tous deux significativement l'activité et l'expression protéique de la PON1 plasmatique, l'écorce présentant l'effet le plus puissant (**Figures 67** et **68**, respectivement). Dans la présente étude, nous avons montré que les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles diminuent légèrement le stress oxydatif sérique. Cela peut être lié à une augmentation de l'activité de la PON1 sérique. Cette augmentation a été significativement plus marquée avec l'extrait phénolique d'écorces ($p < 0,01$) (**Figure 67**) comparée à celle obtenue avec l'extrait d'arilles ($p < 0,05$) ainsi que l'expression de la protéine PON1 ($p < 0,001$, et $p < 0,0001$; respectivement) (**Figure 68**). Ces résultats ont montré que les composés polyphénoliques des extraits de la grenade « Sefri », en particulier dans les extraits de l'écorce (punicalagine, acide gallique et acides ellagiques), ont un effet puissant sur l'activité et l'expression protéique de la PON1 sérique et sont des contributeurs majeurs à ses effets bénéfiques.

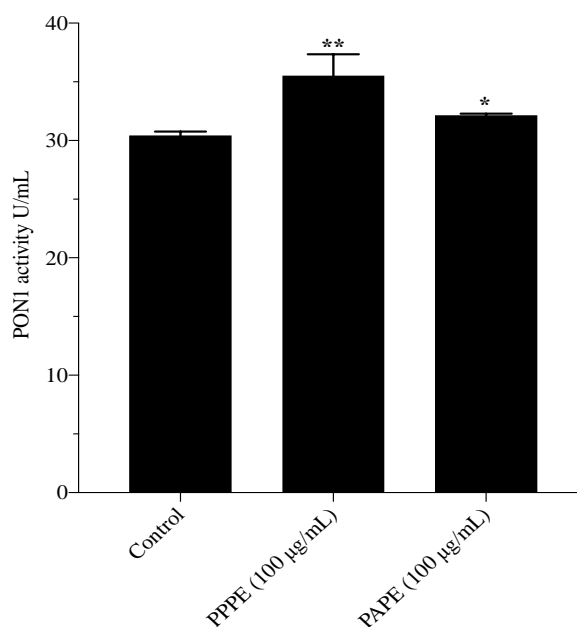


Figure 67: Les polyphénols de grenade améliorent l'activité de la paraxonase (PON1). L'activité de la paraxonase (PON1) a été mesurée dans du plasma enrichi en extrait phénolique de l'écorce ou des arilles pendant 4 h.

*Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm sem de trois essais indépendants. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle.*

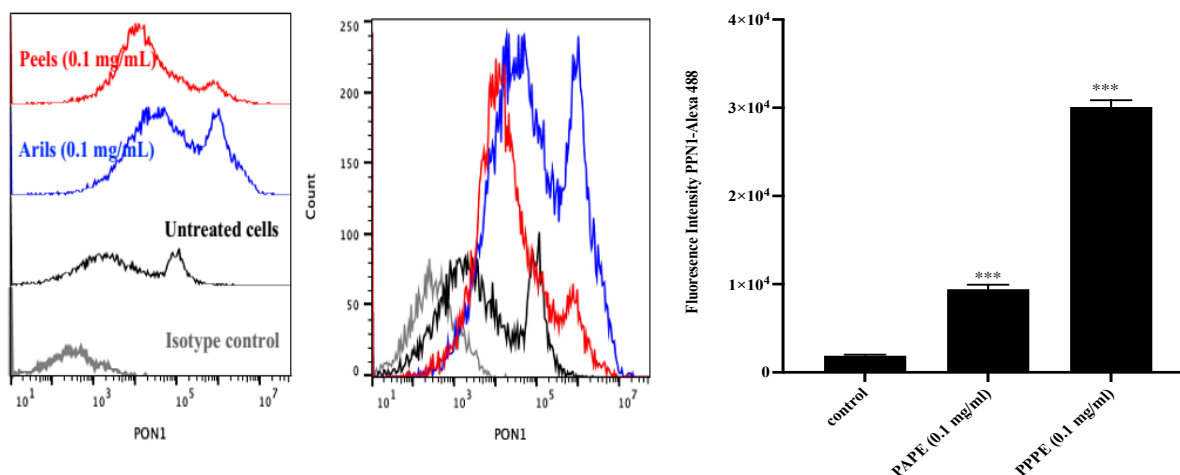


Figure 68: Effet des extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de grenade sur l'expression de la PON1 dans les cellules Fu5AH. Les valeurs des intensités de fluorescence moyennes (MFI) des profils FACS sont indiquées.

*** $p < 0,001$ indique une différence statistiquement significative par rapport au contrôle déterminée par des tests ANOVA à sens unique.

2.2 Effet des extraits phénoliques de la grenade « Sefri » sur le processus oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle clé dans la régulation des processus cellulaires normaux, tandis qu'un déséquilibre des ROS conduit au développement d'un état pathologique chez l'Homme, notamment de cancers. Plusieurs études ont révélé qu'une production élevée de ROS qui active la signalisation pro-tumorigène, améliore la survie et la prolifération des cellules et entraîne des dommages à l'ADN et une instabilité génétique. Les cellules cancéreuses sont des cellules hypoxiques très actives sur le plan métabolique et, en raison d'une croissance massive et d'une irrigation vasculaire insuffisante, elles ont tendance à produire davantage de ROS, qui endommagent l'ADN en se diffusant à travers la membrane mitochondriale, tout en agissant comme des messagers transmetteurs de signaux dans de nombreuses voies moléculaires sensibles à l'oxydoréduction impliquées dans la survie cellulaire, la résistance thérapeutique et la progression. Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans le développement du cancer. C'est pourquoi la réduction du stress oxydatif à l'aide de puissants antioxydants a été utilisée comme une stratégie importante pour la prévention du cancer.

Dans la présente étude, nous avons examiné les effets des extraits phénoliques du grenadier (écorce et arilles) sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la peroxydation lipidique dans les cellules cancéreuses de la vessie humaine J82. Nos résultats montrent que les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles induisent tous deux une

diminution significative de la teneur en ROS dans les cellules J82 de manière dose-dépendante par rapport au contrôle (**Figure 69**). L'extrait phénolique de l'écorce (100-200 µg/ml) a diminué les niveaux de ROS intracellulaires par rapport au contrôle H₂O₂ de 32,04% et 37,95%, respectivement ($p < 0,001$). D'autre part, 100 µg/ml de l'extrait phénolique des arilles n'a provoqué aucune diminution significative des niveaux de ROS intracellulaires alors que 200 µg/ml de l'extrait ont réduit la formation de ROS intracellulaires de 27,83% ($p < 0,001$). Cependant, en termes d'effet antioxydant *in vitro*, l'extrait de l'écorce a réduit la formation de ROS intracellulaires de 10% de plus que l'extrait des arilles.

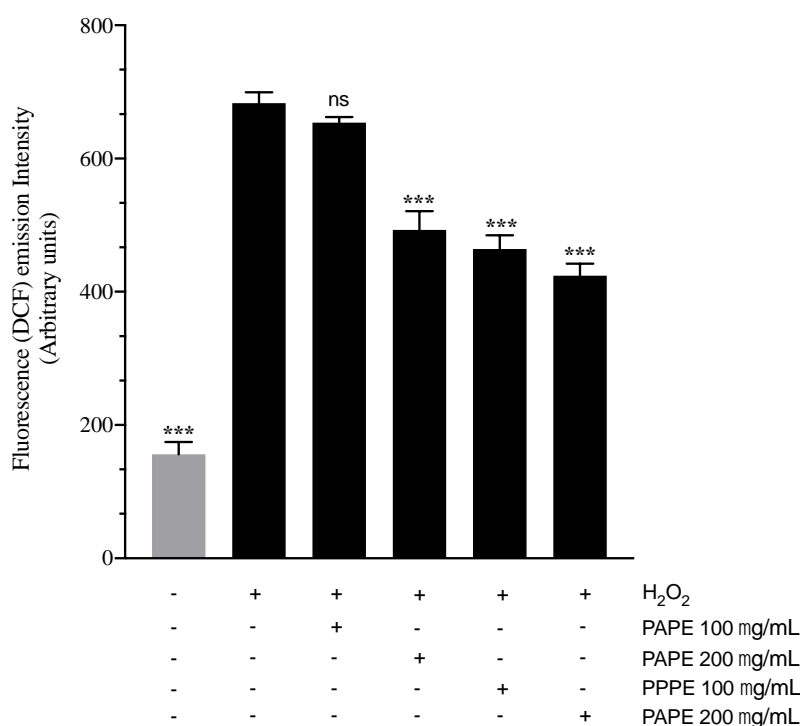


Figure 69: Activité de piégeage des radicaux intracellulaires par les extraits phénoliques du grenadier. Les cellules J82 ont été traitées avec 100 ou 200 µg/ml de l'extrait de l'écorce et des arilles. Les cellules ont été marquées avec 10 µmol/l de DCFH-DA. Les intensités de fluorescence du DCF ont été mesurées.

Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm sem de plus de trois essais indépendants. *** $p < 0,001$ indique une différence significative par rapport au contrôle. ns : pas de signification.

La peroxydation lipidique, qui est une autre approche pour évaluer les dommages oxydatifs, a été quantifiée en mesurant les TBARS (**Figure 70**). Les deux extraits phénoliques utilisés dans la présente étude ont tous deux provoqué une diminution de la peroxydation lipidique par rapport au contrôle. L'extrait phénolique de l'écorce (100 et 200 µg/ml) a provoqué une réduction significative des niveaux de MDA de 39,81 % et 52,58 % ($p < 0,01$),

respectivement, par rapport au contrôle. L'extrait phénolique des arilles (100 et 200 µg/ml) a provoqué une diminution beaucoup plus faible des TBARS de 17,32 % ($p < 0,05$) et 23,4 % ($p < 0,01$), respectivement, que l'extrait de l'écorce.

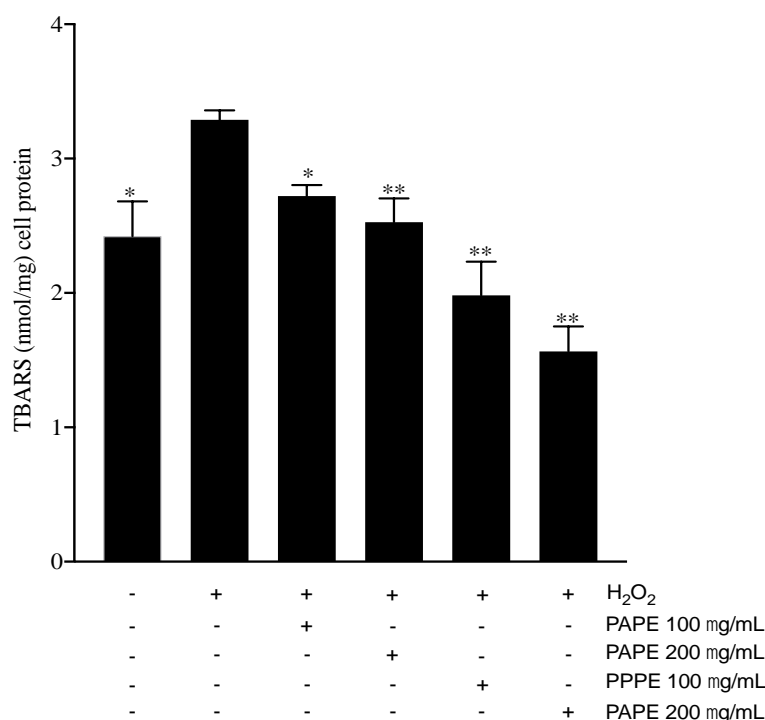


Figure 70: Effets des extraits phénoliques du grenadier sur les niveaux de TBARS dans les cellules J82. Les niveaux de TBARS ont été évalués à l'aide d'un spectrophotomètre.

Toutes les valeurs sont exprimées en tant que moyennes \pm sem de trois essais indépendants. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle (cellules non traitées).

2.3 Effet de l'extrait total de la grenade « Sefri » sur le transport inverse du cholestérol

Dans le but de déterminer le mécanisme d'action via lequel le grenadier a induit un effet athéro-protecteur, nous avons évalué son effet sur le processus de l'efflux du cholestérol (première étape dans le transport inverse du cholestérol) au niveau des macrophages J774. Nos résultats de la **Figure 71**, montre que la stimulation des macrophages par des concentrations croissantes de l'EAG (0.125 à 4 mg/ml), induit une augmentation significative de l'efflux vers l'apoA1 de façon dose-dépendante lorsque comparé au groupe contrôle. L'AMPC a été utilisé comme contrôle positif.

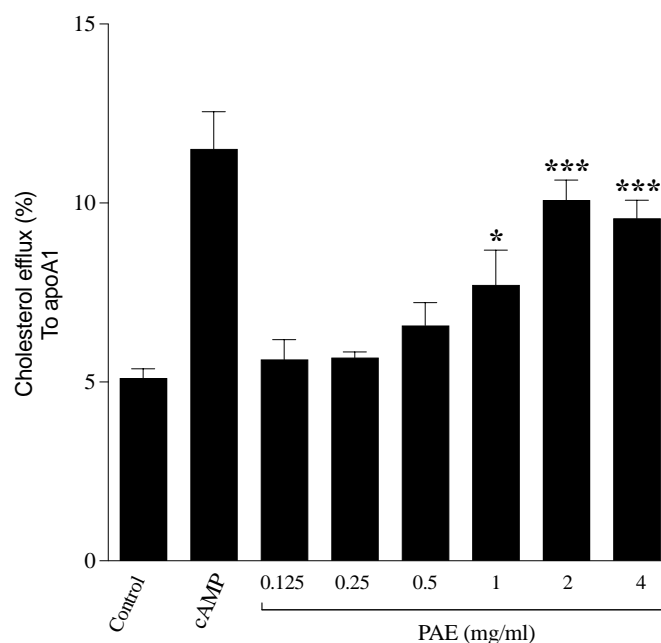


Figure 71: Effet de l'EAG sur l'efflux de cholestérol médié par l'apoA1. Tous les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm sem d'au moins trois essais indépendants.

** $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle (cellules non traitées).*

2.4 Effet de l'extrait des composés phénoliques de grenade « Sefri » sur le transport inverse du cholestérol

Pour déterminer l'effet des composés phénoliques de la grenade « Sefri » sur le transport inverse du cholestérol, l'efflux de cholestérol a été mesuré. L'incubation des macrophages J774 préalablement chargés de ^3H -cholestérol pendant 24 h en présence de concentrations croissantes d'extrait phénolique des arilles ou d'écorce (12.5-200 $\mu\text{g/ml}$), a induit une augmentation significative de l'efflux de cholestérol vers l'apoA1 de manière dose-dépendante ($p < 0.0001$) (**Figure 72, A-C**). Cependant, l'effet de l'extrait phénolique d'écorce reste plus potentiel comparé à celui des arilles (r^2 : 0,8064 contre 0,7890, respectivement. $P < 0.001$). Fait intéressant, pour des concentrations dix fois inférieures aux différents extraits phénoliques, la pré-incubation des macrophages préalablement chargés en ^3H -cholestérol en présence de la punicalagine, augmente significativement l'efflux du cholestérol de manière dose dépendante ($p < 0.001$) (**Figure 72, D**)

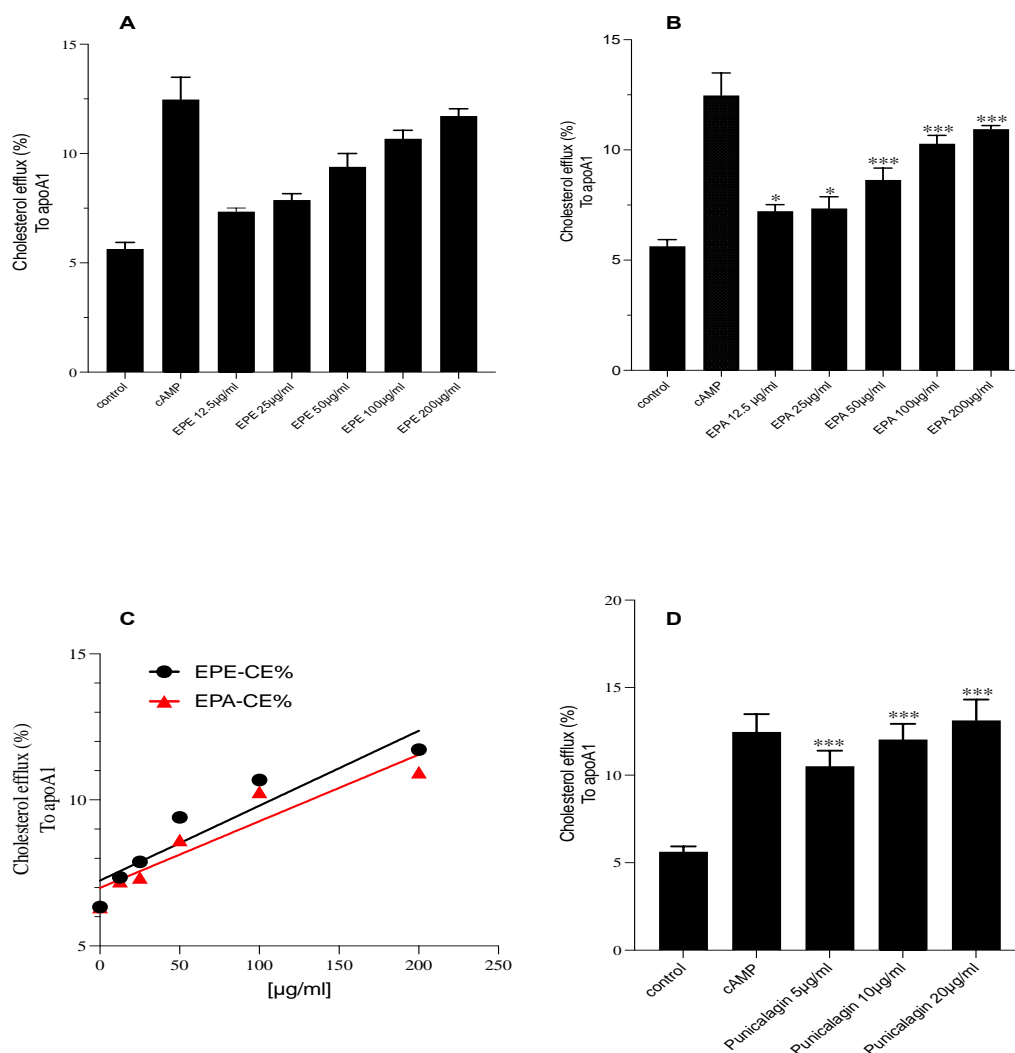


Figure 72: Effet des extraits phénoliques de la grenade et de la punicalagine sur l'efflux de cholestérol médié par l'apoA1. **(A)** EPE : extrait phénolique d'écorce. **(B)** EPA : extrait phénolique des arilles. **(C)** régression linéaire comparative entre l'effet de l'EPE et EPA. **(D)** effet de la Punicalagine.

Tous les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm sem d'au moins trois essais indépendants. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle (cellules non traitées).

2.5 Évaluation de l'effet des extraits du grenadier (Sefri) sur l'expression des transporteurs impliqués dans le processus du transport inverse du cholestérol

L'augmentation de l'efflux de cholestérol à partir des cellules spumeuses dérivées des macrophages est un mécanisme de protection important pour diminuer la charge lipidique dans la plaque d'athérome (Islam et al., 2021). Plusieurs voies impliquées dans l'efflux de cholestérol ont été décrites, telles que le transport du cholestérol médié par le récepteur SR-B1 et les transporteurs ABCA1/ABCG1 (Adorni et al., 2021; Ikhlef et al., 2017; Islam et al., 2021). Cependant, la voie des transporteurs ABCA1 constitue une voie clé dans ce processus

puisque son initiation passe principalement par cette voie qui assure exclusivement le transport du cholestérol vers les (lipids-poor apoA1). Dans le cadre de notre travail, nous avons évalué l'effet du grenadier sur l'expression des transporteurs ABCA1/ABCG1 et LXR dans le but d'établir le mécanisme d'action moléculaire via lequel le grenadier améliore l'épuration du cholestérol.

Nos résultats (**Figure 73**), ont montré que l'incubation des macrophages en présence d'extrait total du grenadier (2 et 4 mg/ml) pendant 12h a induit une augmentation significative des transporteurs ABCA1 et ABCG1, et du récepteur LXR, comparé au contrôle. Ceci montre que le mécanisme d'action de l'EAG passe par une modulation des récepteurs LXR qui entraîne une surexpression et une induction des ABCA1 et ABCG1. De plus, et suite aux résultats obtenus avec les composés phénoliques, nous avons étudié leurs effets sur l'expression des principaux transporteurs du cholestérol. En effet, nos résultats illustrés dans la **Figure 74**, montrent que les extraits phénoliques d'écorce et d'arilles induisent une surexpression des ABCA1 et ABCG1, avec un effet plus prononcé sous l'action de l'extrait phénolique d'écorce, alors qu'aucun effet n'a été observé sur les récepteurs scavengers B1 (SR-B1). Cependant, la punicalagine (principal composé phénolique du grenadier) exerce un effet potentialisateur sur l'expression de l'ABCA1 et ABCG1 plus prononcé que celui exercé par l'EPA et EPE.

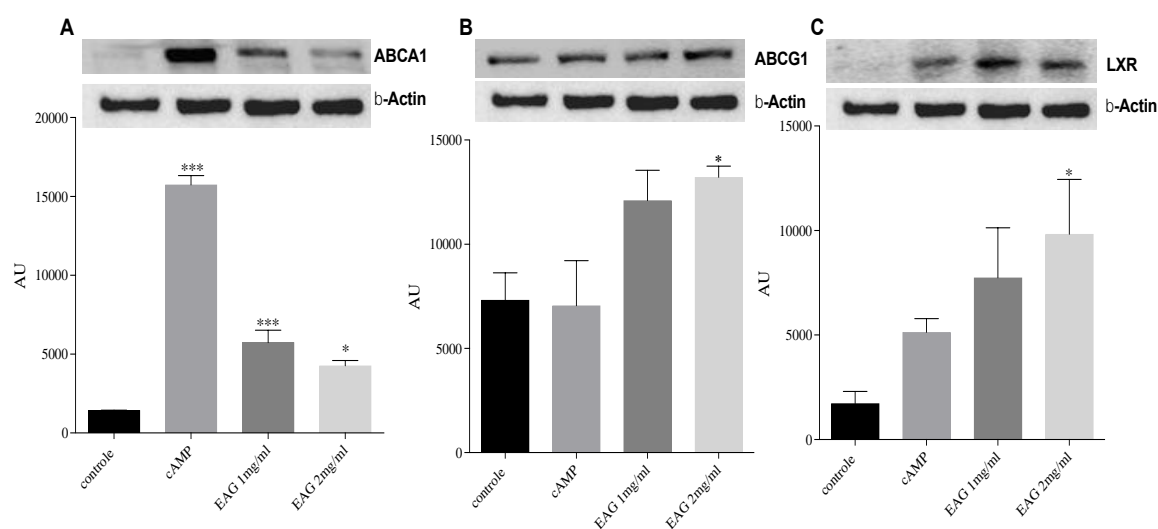


Figure 73: Effet de l'EAG sur l'expression des transporteurs du cholestérol. L'expression des récepteurs ABCA1 (A), ABCG1 (B) et LXR (C) ont été évalué par western blot au niveau des lysats des cellules. La β -actine a été utilisée comme contrôle.

Tous les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm sem d'au moins trois essais indépendants. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ indiquent des différences significatives par rapport au contrôle (cellules non traitées).

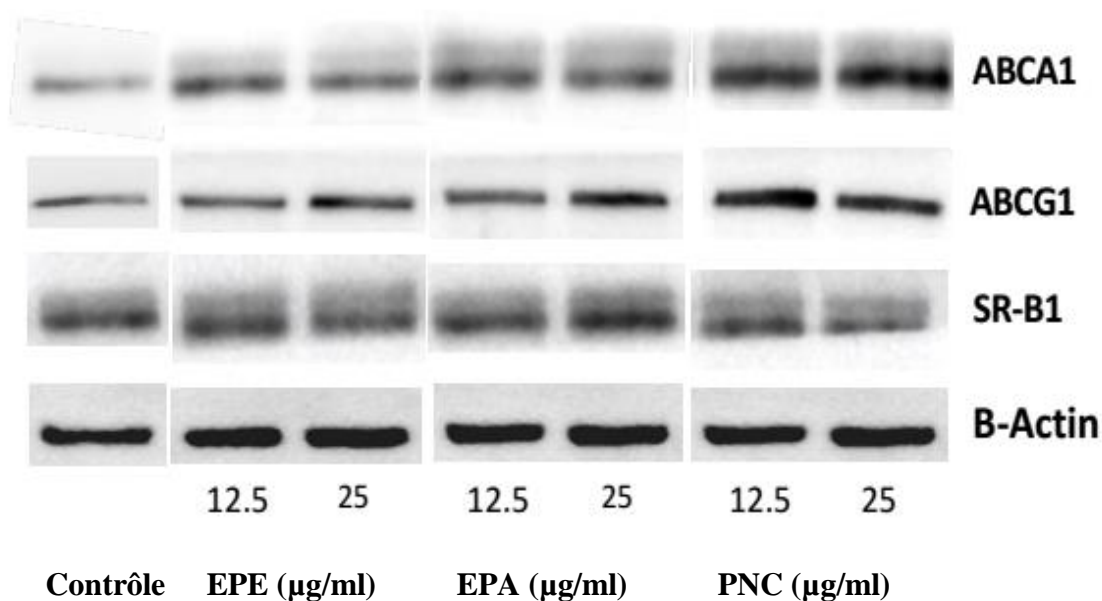


Figure 74: Effet des extraits phénoliques de la grenade (EPA et EPE) et de la punicalagine (PNC) sur l'expression des transporteurs ABCA1, ABCG1 et SR-B1.

L'expression des récepteurs a été évaluée par western blot au niveau des lysats des macrophages J774. La β -actine a été utilisée comme contrôle.

3 Discussion

Les antioxydants naturels ont suscité une grande attention en tant qu'agents préventifs et thérapeutiques de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Hrelia & Angeloni, 2020; Malekmohammad et al., 2019; Song et al., 2021). En effet, la consommation d'aliments riches en composés phénoliques a été positivement corrélée à la réduction du risque de maladies cardiovasculaires en ralentissant la progression de l'athérosclérose, principalement en protégeant les lipoprotéines de la peroxydation lipidique (Islam et al., 2021; Reis et al., 2021; Zhou et al., 2021).

L'écorce, les graines, le jus et les arilles de grenade sont considérés comme une source riche en composés phénoliques possédant des propriétés nutritionnelles (Di Stefano et al., 2019; Russo et al., 2018; Sabraoui et al., 2020). L'écorce de grenade possède une teneur plus élevée en polyphénols que les graines et le jus (Derakhshan et al., 2018). Ces polyphénols comprennent la punicalagine, qui présente une forte activité antioxydante (García et al., 2021). La grenade contient également d'autres polyphénols, notamment des anthocyanines

(delphinidine, cyanidine et pélargonidine 3-glucosides et 3,5- glucosides) ainsi que des flavonols (Moga et al., 2021). La grenade est connue pour ses propriétés thérapeutiques dans la prévention des maladies inflammatoires, le diabète, l'athérosclérose, le stress oxydant, le cancer et les infections microbiennes (Amri et al., 2020; Kalaycıoğlu & Erım, 2017; Kojadinovic et al., 2017; Lavoro et al., 2021; Michicoti-Meneses et al., 2021; Moga et al., 2021; Razani et al., 2017).

Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer les propriétés anti-athérosclérotiques de la grenade, notamment l'inhibition de la peroxydation lipidique, la modulation de l'agrégation plaquettaire, l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses et la réduction de l'inflammation induite par les macrophages (Lavoro et al., 2021; Dongdong Wang et al., 2018). Malgré ces nombreuses études sur le grenadier en général, peu d'études se sont intéressées à l'élucidation des mécanismes d'action liées aux activités antiathérogènes de la variété Sefri, notamment sur l'homéostasie du cholestérol.

Les LDL oxydées jouent un rôle capital dans les stades inflammatoires précoces et plus avancés des lésions athérosclérotiques (Allahverdian et al., 2020; Borén et al., 2020; Su et al., 2021). La progression de l'athérosclérose est ralentie lorsque l'oxydation est inhibée, et il existe une corrélation positive entre la capacité des LDL à résister à l'oxydation et la gravité de l'athérosclérose coronaire. Cependant, l'oxydation des LDL n'est pas le seul facteur impliqué dans l'athérogenèse. Le stress oxydatif altère les propriétés anti-athérogènes des HDL, notamment en altérant leur activité antioxydante et leur capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol et à favoriser son transport inverse (Annema & Eckardstein, 2016; Bonizzi et al., 2021; Chiesa & Charakida, 2019). De plus, l'oxydation peut être directement induite dans les macrophages, ce qui modifie l'expression des récepteurs impliqués dans le flux de cholestérol, qui à leur tour influencent la formation de cellules spumeuses et par la suite le développement de l'athérosclérose (Barrett, 2020; Mushenkova et al., 2021).

Pour mieux comprendre le mécanisme antiathérogène des extraits riches en composés phénoliques de la grenade, nous avons analysé la capacité de ces extraits à inhiber l'oxydation des LDL induite par le cuivre, à empêcher la disparition de la vitamine E (α -tocophérol) et à favoriser l'activité de la paraxonase PON1. Les résultats de l'oxydation des LDL induite par le cuivre (ox-LDL) ont montré que l'extrait de l'écorce et celui des arilles inhibent significativement la formation de diènes conjugués, l'écorce étant plus efficace que les arilles. Cet effet a été confirmé en mesurant la teneur en α tocophérol des LDL oxydées en présence ou en absence des extraits phénoliques du grenadier. L'oxydation des LDL seules a augmenté

le taux de disparition de l' α -tocophérol après 4 h d'incubation. Cependant, les extraits phénoliques de la grenade ont significativement empêché la dégradation de l' α -tocophérol. Les résultats montrent que l'extrait phénolique de l'écorce présente un effet plus puissant que celui des arilles. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Aviram et al. (Aviram et al., 2004) qui ont montré qu'après 12 mois de consommation de jus de grenade, les LDL sériques oxydées et la sensibilité des LDL à l'oxydation induite par les ions de cuivre étaient significativement réduits de 90 % et 59 %, respectivement. *In vitro*, les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade exercent leurs activités antioxydantes en piégeant les radicaux libres et en inhibant l'oxydation des LDL induite par les ions cuivre (Ambigaipalan et al., 2016; Aviram et al., 2008). Les polyphénols sont des antioxydants importants dans les extraits de grenade. Cependant, les différences dans leur capacité antioxydante peuvent être attribuées à différents types de polyphénols et à leur teneur dans divers extraits. Le fort pouvoir antioxydant de l'extrait phénolique de l'écorce peut être dû à son contenu en composés phénoliques et flavonoïdes plus élevé à savoir la punicalagine, l'acide gallique et l'acide ellagique comme l'indique notre analyse HPLC. Ces résultats suggèrent que les polyphénols de l'écorce sont les principaux composants responsables de l'activité antioxydante de la grenade (Kandyliis & Kokkinomagoulos, 2020; Ricci et al., 2006; Zhang et al., 2007).

L'activité de la paroxonase (PON1) a été évaluée en présence des extraits phénoliques de la grenade Sefri (écorce et arilles). La paroxonase (PON1), une estérase associée aux HDL, hydrolyse les lipides oxydés, qui sont inactivés en cas de stress oxydatif. L'incubation du plasma humain avec les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade a montré une augmentation significative de l'activité de la paroxonase (PON1) plasmatique avec un effet plus marqué de l'extrait de l'écorce. Ceci peut être lié à un effet probable des composés phénoliques sur la stimulation de l'activité enzymatique de la PON1. Ces résultats montrent que les composés polyphénoliques présents dans les extraits de la grenade, en particulier dans l'écorce (punicalagine, acide gallique et acides ellagiques), ont un effet puissant sur l'activité de la paroxonase (PON1) sérique et contribuent largement à ses effets bénéfiques. Cette protection est probablement le résultat de la capacité de la paroxonase (PON1) à hydrolyser des lipides oxydés spécifiques dans les lipoprotéines oxydées (Aviram et al., 2005). Ces effets bénéfiques de la consommation de la grenade sur la stabilité et l'activité de la paroxonase (PON1) sérique pourraient contribuer à retarder le développement de l'athérosclérose. L'administration d'extraits de grenade à des souris déficientes en Apo-E a augmenté l'activité

de la paraxonase (PON1) sérique, le jus de fruit entier étant plus efficace que le jus d'arille (Aviram et al., 2008). Chez des souris obèses, une supplémentation quotidienne en jus de grenade a réduit le stress oxydant et a augmenté l'expression et l'activité de la paraxonase (PON1) sérique (Kandyli & Kokkinomagoulos, 2020; Mowyna et al., 2019). Aviram et al. (Michael Aviram et al., 2008) ont montré que la consommation de jus et les arilles de la grenade a induit une augmentation significative de 43% et 22% de l'activité de la paraxonase (PON1) sérique, respectivement, alors que la peau de grenade n'avait aucun effet significatif. Ces mêmes travaux ont montré que le jus de grenade peut préserver et augmenter l'activité de la paraxonase (PON1) pendant l'oxydation des lipoprotéines. De plus, une étude clinique récente réalisée par Estrada-Luna et al. (Estrada-Luna et al., 2019) et une étude réalisée sur des lapins par Dorantes-Morales et al. (Dorantes-Morales et al., 2020) ont toutes deux montré que la supplémentation avec une préparation à base d'arille de grenade a amélioré de manière significative l'activité de la paraxonase (PON1). De plus, Estrada-Luna et al. (Estrada-Luna et al., 2017) ont montré que la consommation de jus de grenade frais a provoqué une augmentation de l'activité de la paraxonase (PON1) chez des souris soumises à un régime hypercalorique. Ces résultats indiquent qu'il existe une corrélation négative entre l'activité de la paraxonase 1 (PON1) sérique et la peroxydation lipidique (Aviram et al., 2000). Nos résultats suggèrent que la grenade peut présenter une source importante de composés phénoliques qui peuvent prévenir l'apparition de l'athérosclérose et par conséquent le développement de maladies cardiovasculaires, en inhibant l'oxydation des lipoprotéines, en réduisant la teneur en peroxyde et en augmentant l'activité de la paraxonase 1 (PON1).

Les cellules cancéreuses multiplient plus vite dans des conditions de stress oxydant car cela augmente leur potentiel de survie via diverses voies qui induisent l'activation de la signalisation redox qui, à son tour, peut entraîner l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs, l'activation de facteurs de transcription nucléaire tels que l'AP1 (activator protein 1) et NF- κ B (nuclear factor kappa B), ou l'activation de mutations ponctuelles. Une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules peut entraîner de nombreux effets néfastes, notamment des modifications oxydatives des lipides, des protéines et de l'ADN, susceptibles de provoquer diverses maladies.

Dans la présente étude, nous avons examiné les effets des extraits phénoliques du grenadier (écorce et arilles) sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la peroxydation lipidique dans les cellules cancéreuses de la vessie humaine J82. Nos résultats montrent que les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade Sefri induisent

tous deux une diminution significative de la teneur en ROS au niveau des cellules J82 de manière dose-dépendante par rapport au contrôle. Cependant, en termes d'effet antioxydant, l'extrait de l'écorce a réduit la formation de ROS intracellulaires plus grande que celle de l'extrait des arilles. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Rosenblat et al. (Rosenblat et al., 2013) qui ont montré que les composés phénoliques de la grenade, en particulier la punicalagine et l'acide gallique, réduisent de façon significative la formation des ROS dans les cellules J774.

La peroxydation lipidique, qui est une autre approche pour évaluer les dommages oxydatifs, a été quantifiée en mesurant les TBARS. Les deux extraits phénoliques utilisés dans la présente étude ont tous deux provoqué une diminution de la peroxydation lipidique par rapport au contrôle. L'extrait phénolique de l'écorce a provoqué une réduction significative des niveaux de MDA par rapport au contrôle. En revanche, l'extrait phénolique des arilles a provoqué une diminution beaucoup plus faible des TBARS en le comparant avec l'extrait de l'écorce. Park et al. (Park et al., 2016) ont montré que l'extrait de l'écorce a provoqué une diminution des niveaux des ROS dans les monocytes THP-1 exposées à la cytotoxicité induite par les particules PM10. (Zaid et al., 2007), ont rapporté que l'extrait de fruit de grenade riche en polyphénols a diminué la peroxydation lipidique dans les kératinocytes humains immortalisés HaCaT après un stress oxydant induit par les rayons UV-B et le photo-vieillessement. La grenade a réduit de manière significative l'accumulation de peroxydes, ce qui suggère que la grenade peut inhiber la production des ROS et la peroxydation lipidique grâce à sa richesse en composés phénoliques antioxydants. Cependant, une étude menée par Elango et al. (Elango et al., 2011) ont montré que 20 µg/ml d'acide gallique isolé de l'extrait d'écorce de grenade a augmenté les niveaux de ROS et induisait ainsi l'apoptose des cellules A549 par une voie intrinsèque.

L'accumulation excessive de lipides dans les macrophages peut conduire à la formation de cellules spumeuses, ces dernières jouent un rôle capital dans l'apparition de l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (Kim et al., 2020; Qian et al., 2021). Le transport du cholestérol vers les macrophages, première étape du transport inverse du cholestérol, est considéré comme une étape cruciale au stade précoce de l'athérosclérose. Les protéines membranaires, ABCA1 et ABCG1, jouent un rôle clé dans l'efflux de cholestérol à partir des macrophages (Zhang et al., 2021). L'exposition des macrophages à des LDL oxydées a fortement favorisé l'induction d'ABCA1 et d'ABCG1. Lorsque les extraits phénoliques de la grenade ont été incubés avec les macrophages exposés aux LDL oxydées,

l'expression de ces protéines a encore augmenté. La grenade favorise donc l'efflux de cholestérol à partir des cellules spumeuses. Les études d'Aviram et al. ont rapporté que l'efflux de cholestérol médié par les HDL à partir des macrophages J774 a augmenté après l'incubation des cellules avec du jus, d'écorce ou des arilles de grenade. Les composés phénoliques de la grenade ont réduit les lésions athérosclérotiques et augmenté l'activité cellulaire de la PON2 dans les macrophages J774 et les macrophages péritonéaux de souris déficientes en apoE athérosclérotique (Aviram et al., 2008). Chez les hamsters, l'acide ellagique de la grenade a augmenté la concentration plasmatique de cholestérol HDL en augmentant les niveaux d'ARNm de LXR α , ABCA1, PPAR α et PPAR γ (Liu et al., 2015). Le jus de grenade a significativement augmenté l'efflux de cholestérol des macrophages chez les souris E0 (Kaplan et al., 2001). Rosenblat et al. ont révélé une augmentation considérable de l'efflux de cholestérol médié par les HDL via la stimulation de l'expression de la PON2 des macrophages après administration du jus de grenade, dans des macrophages obtenus à partir de souris PON1- et PON2-knockout (Rosenblat et al., 2010).

Pour étudier le mécanisme par lequel les extraits de grenade induit une augmentation de l'efflux de cholestérol vers l'apoA-1, nous avons réalisé des analyses western blot pour mesurer l'expression protéique des transporteurs ABCA1, ABCG1, LXR et SR-B1 sur les macrophages J774 incubés avec les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade. Nous avons observé une augmentation de l'expression protéique des ABCG1, ABCG1, LXR et du récepteur scavenger SR-B1 en fonction de la concentration de grenade dans les macrophages J774 incubés avec les extraits phénoliques. Ces résultats sont en accord avec ceux rapporté par Park et al. qui ont montré que l'acide ellagique présent dans les arilles et les graines de grenade a augmenté l'efflux de cholestérol dans les macrophages J774 en induisant l'expression d'ABCA1 et en supprimant le récepteur SR-B1 via la voie de signalisation PPAR γ /LXR α (Park et al., 2011). De plus, Zhao et al. ont également démontré que les polyphénols de l'écorce de grenade réduisaient l'afflux de cholestérol en régulant l'expression de la protéine et de l'ARNm de CD36 et en augmentant l'efflux de cholestérol médié par l'apoA-1 dans les macrophages raw 264.7 par une augmentation de l'expression de LXR α et ABCA1 (Zhao et al., 2016). En revanche, le jus de grenade à inhiber la formation de cellules spumeuses de macrophages J774 et la formation de lésions athérosclérotiques, qui n'ont pas été médiées par la régulation de l'expression de CD36. De plus, le jus de grenade n'a pas affecté l'efflux de cholestérol des macrophages J774. A1 (Fuhrman et al., 2005).

4 Conclusion et perspectives

Les fruits sont considérés comme une source riche en vitamines, en minéraux et en composés biologiquement actifs. Cependant, ils sont souvent consommés sans leurs écorces alors que certaines écorces de fruits sont riches en composés polyphénoliques, flavonoïdes, acide ascorbique et autres composés biologiquement actifs qui ont un effet bénéfique pour la santé. Nos résultats montrent que les extraits d'écorce et d'arille de grenade augmentent l'activité de la PON1 sérique, ce qui peut retarder le développement et la progression de l'athérosclérose. Nous également montré que les extraits phénoliques de la grenade Sefri atténuent la production de ROS et la peroxydation lipidique dans les cellules cancéreuses humaines J82 de la vessie. Ces résultats indiquent que les extraits de grenade provenant d'écorce et des arilles protègent contre le stress oxydant et présentent une activité anticarcinogène contre les cellules J82. De plus, notre étude a montré que les extraits phénoliques de la grenade Sefri augmentaient l'efflux de cholestérol médié par l'apoA-1 dans les macrophages J774 en régulant l'expression des protéines ABCA1, ABCG1, LXR et des récepteurs SR-B1. Ces résultats suggèrent que les extraits phénoliques de grenade peuvent inhiber l'accumulation de cholestérol et augmenter l'efflux de cholestérol dans les macrophages pour retarder ou même arrêter la formation de cellules spumeuses. En outre, le mécanisme de ces extraits sur l'expression de ces transporteurs, et aussi la vérification de la cible spécifique dans l'efflux du cholestérol devraient être exploré. Enfin, la grenade peut être considéré comme une source importante de molécules bioactives capables de prévenir l'athérosclérose et par la suite prévenir l'apparition des maladies cardiovasculaires.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'athérosclérose est une pathologie chronique multifactorielle qui se développe sur plusieurs années et dont les symptômes n'apparaissent qu'aux stades avancés de la maladie. L'inflammation, le stress oxydant et le dysfonctionnement endothélial sont associés à la pathogenèse de l'athérosclérose. Les polyphénols sont des composants naturels des fruits et légumes qui font actuellement l'objet d'un grand intérêt nutritionnel et thérapeutique. Les résultats des études épidémiologiques suggèrent que l'adoption d'un régime riche en polyphénols peut protéger contre les maladies cardiovasculaires, tandis que les études sur le modèle animal et chez l'homme indiquent des effets protecteurs cardiovasculaires des aliments riches en composés phénoliques. Les mécanismes par lesquels ces composés exercent leurs effets protecteurs cardiovasculaires ne sont pas concluants. L'hypothèse selon laquelle les polyphénols alimentaires protègent contre l'athérosclérose en prévenant un ou plusieurs processus impliqués dans la progression de la maladie, tels que le stress oxydant, l'inflammation et le dysfonctionnement endothélial, est largement répandue.

C'est dans ce contexte que se sont situés nos travaux de recherche, portant sur le grenadier *Punica granatum* L., la variété « Sefri » d'Ouled Abdellah, région de Béni Mellal-Khénifra. Le but de cette thèse était d'étudier l'impact de matrices riches en composés phénoliques extraits de cette plante, dans un modèle simplifié de dysfonction endothéliale. Des études *in vitro* visant à étudier leur capacité à empêcher l'oxydation des LDL, ou à contrer les effets cytotoxiques et inflammatoires des LDL oxydées ont tout d'abord été réalisés, puis nous avons testé les capacités antiathérogène chez des rats *Wistar* soumis à un régime hypercalorique et hypocholestérolémiant capable d'augmenter le statut inflammatoire des plaques d'athérosclérose.

En conclusion, la présente étude a démontré que les extraits phénoliques de l'écorce et des arilles de la grenade « Sefri » possèdent des effets hypolipémiants et hypoglycémiant très élevés. Ils ont pu réduire de manière significative les concentrations de CT, TG et de LDL-C sériques et augmenter le niveau de HDL-C sérique avec une diminution des dépôts lipidiques au niveau des organes et le statut oxydant dans le plasma. L'analyse phytochimique par HPLC a montré une richesse de ces extraits en α et β punicalagine. Ces extraits sont montrés une capacité antioxydante importante liée à la réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des TBRAS et le piégeage des radicaux libres intracellulaires au niveau des cellules cancéreuses (J82). De plus, ces extraits phénoliques ont augmenté l'efflux du cholestérol vers

l'apo A1, l'expression des transporteurs du cholestérol, à savoir l'ABCA1, ABCG1, LXR et les récepteurs SR-B1 au niveau des macrophages J774 ainsi que de l'activité de la paraoxonase 1 (PON1).

Les présents résultats suggèrent que la grenade « Sefri » exerce une activité antioxydante importante ainsi qu'un puissant effet antiathérogène chez le modèle animal. Cet effet pourrait être dû à sa richesse en composés phénoliques, qui pourraient avoir la capacité de réagir pour piéger les radicaux libres afin de prévenir la peroxydation des lipides. Par conséquent, la grenade « Sefri » pourrait être exploitée comme supplément alimentaire dans la prévention de pathologies métaboliques et le développement des maladies cardiovasculaires.

Pour conclure, ces activités biologiques valident scientifiquement quelques usages traditionnels du fruit du grenadier, et ne peuvent être attribuées qu'à une partie des composés phénoliques. Comme complément à ce présent travail, les points suivants nous semblent pertinents :

- Établir le profil phénolique par des méthodes analytiques performantes (HPLC) des extraits phénoliques d'autres parties du fruit, purifier leurs constituants et étudier leurs structures pour mettre le point sur ceux dotés d'activités biologiques.
- Entreprendre plus de travaux sur les différentes activités biologiques de la grenade afin de pouvoir isoler des composés actifs et ouvrir d'autres possibilités d'exploitation en biotechnologie et en médecine.
- Cependant, des études approfondies sont nécessaires afin de comprendre le mécanisme d'action du composé actif de la grenade, ainsi que le mécanisme moléculaire impliqué dans l'inflammation promue par ce nutraceutique. Néanmoins, la consommation de la grenade pourrait être utilisée comme complément dans le traitement préventif de l'athérosclérose.

Références bibliographiques

- Abdel-Hady, N. . (2013). Quantitative Diversity of Phenolic Content in Peels of Some Selected Egyptian Pomegranate Cultivars Correlated to Antioxidant and Anticancer Effects. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(8), 4823–4830.
- Abdel, M., Ibrahim, R., Ali, H., & Okail, M. (2016). Ameliorative Effects of Pomegranate Peel Extract on Hepatotoxicity Induced by Carbon Tetrachloride in Mice Ameliorative Effects of Pomegranate Peel Extract on Hepatotoxicity Induced by Carbon Tetrachloride in Mice. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 4(10), 23–31.
- Abdou, H. M., Yousef, M. I., & Newairy, A. A. (2018). Triton WR-1339-induced hyperlipidemia, DNA fragmentation, neurotransmitters inhibition, oxidative damage, histopathological and morphometric changes: the protective role of soybean oil. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79(51), 1–12.
- Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2890–2901.
- Abraham, P., Wilfred, G., & Ramakrishna, B. (2002). Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clinica Chimica Acta*, 325, 117–125.
- Abu Sitta, K. H., Shomah, M. S., & Salhab, A. S. (2009). Hepatotoxicity of teucrium polium L tea: Supporting evidence in mice models. *Australian Journal of Medical Herbalism*, 21(4), 106–109.
- Achraf, A., Hamdi, C., Turki, M., Abdelkarim, O., Ayadi, F., Hoekelmann, A., Yaich, S., & Souissi, N. (2018). Natural pomegranate juice reduces inflammation, muscle damage and increase platelets blood levels in active healthy Tunisian aged men. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(1), 45–48.
- Adaramoye, O., Erguen, B., Nitzsche, B., Höpfner, M., Jung, K., & Rabien, A. (2017). Punicalagin, a polyphenol from pomegranate fruit, induces growth inhibition and apoptosis in human PC-3 and LNCaP cells. *Chemico-Biological Interactions*, 274, 100–106.
- Adiba, A., Hssaini, L., Haddioui, A., Hamdani, A., Charafi, J., El Iraqui, S., & Razouk, R. (2021). Pomegranate plasticity to water stress: attempt to understand interactions between cultivar, year and stress level. *Heliyon*, 7(6), 1–9.
- Adorni, M. P., Ronda, N., Bernini, F., & Zimetti, F. (2021). High Density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity and Atherosclerosis in Cardiovascular Disease: Pathophysiological Aspects and Pharmacological Perspectives. *Cells*, 10(3).
- Afaq, F., Zaid, M. A., Khan, N., Dreher, M., & Mukhtar, H. (2009). Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Experimental Dermatology*, 18(6), 553–561.
- Aguilar-Ballester, M., Herrero-Cervera, A., Vinué, Á., Martínez-Hervás, S., & González-Navarro, H. (2020). Impact of cholesterol metabolism in immune cell function and atherosclerosis. *Nutrients*, 12(7), 1–19.
- Akbarpour, V., Hemmati, K., & Sharifani, M. (2009). Physical and Chemical Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit in Maturation Stage. *Environ. Sci*, 6(4), 411–416.
- Akhigbe, R., & Ajayi, A. (2021). The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. *Lipids in Health and Disease*, 20(1), 1–18.
- Al-Maiman, S. A., & Ahmad, D. (2002). Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry*, 76(4), 437–441.
- Al-Naqeeb, G., Ismail, M., & Al-Zubairi, A. S. (2009). Fatty acid profile, α -tocopherol content and total antioxidant activity of oil extracted from *Nigella sativa* seeds. *International Journal of Pharmacology*, 5(4), 244–250.
- Al-Said, F. A., Opara, L. U., & Al-Yahyai, R. A. (2009). Physico-chemical and textural quality attributes

- of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 129–134.
- Al-shaabi, S. N. K., Waly, M. I., Al-subhi, L., & Tageldin, M. H. (2016). Ameliorative Effects of Pomegranate Peel Extract against Dietary-Induced Nonalcoholic Fatty Liver in Rats. *Preventive Nutrition and Food Sciences*, 21(1), 14–23.
- Alcaraz-Mármol, F., Nuncio-Jáuregui, N., García-Sánchez, F., Martínez-Nicolás, J. J., & Hernández, F. (2017). Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Scientia Horticulturae*, 219, 152–160.
- Aleksandrova, K., Koelman, L., & Rodrigues, C. E. (2021). Dietary patterns and biomarkers of oxidative stress and inflammation: A systematic review of observational and intervention studies. *Redox Biology*, 42, 101869.
- Alfarisi, H. A. H., Mohamed, Z. B. H., & Ibrahim, M. Bin. (2020). Basic pathogenic mechanisms of atherosclerosis. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 116–125.
- Ali, H. M. (2016). Influence of Pomegranate *Punica granatum* as Phytochemical Rich Components on Yoghurt Drink Characteristics. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 6(1), 23–26.
- Ali, S. I., El-Baz, F. K., El-Emary, G. A. E., Khan, E. A., & Mohamed, A. A. (2014). HPLC-analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(4), 348–355.
- Alissa, E. M., & Ferns, G. A. (2017). Dietary fruits and vegetables and cardiovascular diseases risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1950–1962.
- Allahverdian, S., Ortega, C., & Francis, G. A. (2020). Smooth Muscle Cell-Proteoglycan-Lipoprotein Interactions as Drivers of Atherosclerosis. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 1–24).
- Aloqbi, A., Omar, U., Youss, M., Grace, M., Lila, M. A., & Howell, N. (2016). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Punicalagin. *Natural Science*, 08(06), 235–246.
- Altunkaynak, B. Z., & Ozbek, E. (2009). Overweight and structural alterations of the liver in female rats fed a high-fat diet: A stereological and histological study. *Turkish Journal Gastroenterol*, 20, 93–103.
- Ambigaipalan, P., Camargo, A. C. de, & Shahidi, F. (2016). Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 6584–6604.
- Amri, Z., Raâfet, M., Khedher, B., Zaibi, M. S., Kharroubi, W., & Turki, M. (2020). Anti-diabetic effects of pomegranate extracts in long-term high fructose-fat fed rats. *Clinical Phytoscience*, 6(55), 1–9.
- Amri, Z., Zaouay, F., Lazreg-Aref, H., Soltana, H., Mneri, A., Mars, M., & Hammami, M. (2017). Phytochemical content, Fatty acids composition and antioxidant potential of different pomegranate parts: Comparison between edible and non edible varieties grown in Tunisia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 274–280.
- An, J., Guo, Y., Wang, T., Pantuck, A. J., & Rettig, M. B. (2015). Pomegranate extract inhibits EMT in clear cell renal cell carcinoma in a NF-KB and JNK dependent manner. *Asian Journal of Urology*, 2(1), 38–45.
- Anitschkow, N., & Chalator, S. (1983). Classics in Arteriosclerosis Research On Experimental Cholesterin Steatosis and Its Significance in the Origin of Some Pathological Processes. *Arteriosclerosis*, 3(2), 178–182.
- Annema, W., & Eckardstein, A. Von. (2016). Dysfunctional high-density lipoproteins in coronary heart disease: implications for diagnostics and therapy. *Translational Research*, 173, 30–57.
- Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International*, 49(1), 345–353.
- Arvanitidis, A. P., Corbett, D., & Colbourne, F. (2009). A high fat diet does not exacerbate CA1 injury

- and cognitive deficits following global ischemia in rats. *Brain Research*, 1252, 192–200.
- Ashoor, I. F., Mansfield, S. A., O'Shaughnessy, M. M., Parekh, R. S., Zee, J., Vasylyeva, T. L., Kogon, A. J., Sethna, C. B., Glenn, D. A., Chishti, A. S., Weaver, D. J., Helmuth, M. E., Fernandez, H. E., Rheault, M. N., Kallash, M., Gipson, P., Malaga-Diequez, L., Gillespie, B., Gipson, D. S., ... Robinson, B. M. (2019). Prevalence of Cardiovascular Disease Risk Factors in Childhood Glomerular Diseases. *Journal of the American Heart Association*, 8(14), 1–12.
- Asija, R., & Singh, C. (2016). A Comprehensive Review on Antihyperlipidemic Activity of Various A Comprehensive Review on Antihyperlipidemic Activity of Various Medicinal Plants. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7(6), 407–415.
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.
- Atar, D., Jukema, J. W., Molemans, B., Taub, P. R., Goto, S., Mach, F., CerezoOlmos, C., Underberg, J., Keech, A., Tokgözoğlu, L., & Bonaca, M. P. (2021). New cardiovascular prevention guidelines: How to optimally manage dyslipidaemia and cardiovascular risk in 2021 in patients needing secondary prevention? *Atherosclerosis*, 319, 51–61.
- Auger, C., Said, A., Nguyen, P. N., Chabert, P., Idris-khodja, N., & Schini-kerth, V. B. (2016). Potential of Food and Natural Products to Promote Endothelial and Vascular Health. *J Cardiovasc Pharmacol*, 68(1), 11–18.
- Aviram, M., Kaplan, M., Rosenblat, M., & Fuhrman, B. (2005). Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 170, 263–300.
- Aviram, Michael, Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., & Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress , atherogenic modifications to LDL , and platelet aggregation : studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E – deficient mice. *Am J Clin Nutr*, 71(5), 1062–1076.
- Aviram, Michael, Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., & Hayek, T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness , blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*, 23, 423–433.
- Aviram, Michael, Volkova, N., Coleman, R., Dreher, M., Reddy, M. K., Ferreira, D., & Rosenblat, M. (2008). Pomegranate Phenolics from the Peels , Arils , and Flowers Are Antiatherogenic : Studies in Vivo in Atherosclerotic Apolipoprotein E-Deficient (E 0) Mice and in Vitro in Cultured Macrophages and Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1148–1157.
- Azizuddin, & Ghafoor, S. (2018). The Study of Changes in Physical Attributes, Chemical Composition, Phenolic Evaluation and Antioxidant Capacity of Pomegranate Fruit During Storage. *Analytical Chemistry Letters*, 8(6), 769–781.
- Babaniamansour, P., Mohammadi, M., Babaniamansour, S., & Aliniagerdroudbari, E. (2020). The relation between atherosclerosis plaque composition and plaque rupture. *Journal of Medical Signals and Sensors*, 10(4), 267–274.
- Bäck, M., Jr, A. Y., Tabas, I., Öörni, K., & Kovanen, P. T. (2019). Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*, 16(7), 389–406.
- Bagri, P., Ali, M., Sultana, S., & Aeri, V. (2010). New flavonoids from punica granatum flowers. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(2), 201–204.
- Bais, S., Singh, G. S., & Sharma, R. (2014). Antiobesity and Hypolipidemic Activity of Moringa oleifera Leaves against High Fat Diet-Induced Obesity in Rats. *Advanced in Biology*, 2014, 1–9.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.

- Banach, M., Rizzo, M., Toth, P. P., Farnier, M., Davidson, M. H., Al-rasadi, K., Aronow, W. S., Athyros, V., Djuric, D. M., Ezhov, M. V., Greenfield, R. S., Hovingh, G. K., Kostner, K., Serban, C., Ligezan, D., Fras, Z., Moriarty, P. M., Muntner, P., Goudev, A., ... Mikhailidis, D. P. (2015). Statin intolerance - an attempt at a unified definition . Position paper from an International Lipid Expert Panel. *Expert Opinion*, 14(6), 935–955.
- Banihani, S. A., Shuaibu, S. M., Al-husein, B. A., & Makahleh, S. S. (2019). *Fresh Pomegranate Juice Decreases Fasting Serum Erythropoietin in Patients with Type 2 Diabetes Saleem*. 2019.
- Banihani, S., Swedan, S., & Alguraan, Z. (2013). Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 33(5), 341–348.
- Bar-ya, I., Tian, L., Amir, R., & Holland, D. (2019). Primary Metabolites , Anthocyanins , and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–19.
- Barati Boldaji, R., Akhlaghi, M., Sagheb, M. M., & Esmaeilnezhad, Z. (2020). Pomegranate juice improves cardiometabolic risk factors, biomarkers of oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients: a randomized crossover trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 846–854.
- Barbero, G. F., Liazid, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75(5), 1332–1337.
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Daga, M., Dianzani, C., Arcaro, A., Cetrangolo, G. P., Giordano, G., Cucci, M. A., Graf, M., & Gentile, F. (2018). Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants*, 7(8), 1–17.
- Barrett, T. J. (2020). Macrophages in Atherosclerosis Regression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(1), 20–33.
- Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R., & Mallat, Z. (2019). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, 16(12), 727–744.
- Behbahani, M., Ali, A. M., Muse, R., & Mohd, N. B. (2007). Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of leaves of *Barringtonia racemosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(5), 095–102.
- Belcastro, E. (2017). *Inflammation and oxidative stress in atherosclerosis : role of S-nitrosothiols in the vascular responses*.
- Belkacem, N., Djaziri, R., Lahfa, F., El-Haci, I. A., & Boucherit, Z. (2014). Screening phytochimique et activité antioxydante in vitro de différents extraits de l'épicarpe de *Punica granatum* L. d'Algérie : étude comparative. *Phytotherapie*, 12(6), 372–379.
- Bellesia, A., Verzelloni, E., & Tagliacozzi, D. (2015). Pomegranate ellagitannins inhibit α -glucosidase activity in vitro and reduce starch digestibility under simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(1), 85–92.
- Belo, V. A., Guimarães, D. A., & Castro, M. M. (2016). Matrix metalloproteinase 2 as a potential mediator of vascular smooth muscle cell migration and chronic vascular remodeling in hypertension. *Journal of Vascular Research*, 52(4), 221–231.
- Benchagra, L., Berrougui, H., Islam, M. O., Ramchoun, M., Boulbaroud, S., Hajjaji, A., Fulop, T., Ferretti, G., & Khalil, A. (2021). Antioxidant effect of moroccan pomegranate (*Punica granatum* L. sefri variety) extracts rich in punicalagin against the oxidative stress process. *Foods*, 10(9), 1–18.
- Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., & El Hady, S. (2013). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 173–181.
- Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Chiuve, S. E., Cushman, M., Dellinger, F. N., Deo, R., De Ferranti, S. D., Ferguson, J. F., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jiménez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., ... Muntner, P. (2018). Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*, 137, 67–492.
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture.

- Circulation Research*, 114(12), 1852–1866.
- Berrougui, H., Cloutier, M., Isabelle, M., & Khalil, A. (2006). Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 184(2), 389–396.
- Berrougui, H., Grenier, G., Loued, S., Drouin, G., & Khalil, A. (2009). A new insight into resveratrol as an atheroprotective compound: Inhibition of lipid peroxidation and enhancement of cholesterol efflux. *Atherosclerosis*, 207(2), 420–427.
- Bhandary, S. K., Kumari, S., Bhat, V., Sherly, S., & Bekal, M. P. (2012). Preliminary Phytochemical Screening of Various Extracts of *Punica Granatum* Peel, Whole Fruit and Seeds. *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 02(04), 34–38.
- Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., Duraivel, S., Aravind, G., & Kumar, K. P. S. (2013). Medicinal Uses of *Punica granatum* and Its Health Benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(5), 28–35.
- Binmowyna, M. N., Alfaris, N. A., Almnaizel, A. T., Alsayadi, M. M., & Al-sanea, E. A. (2020). Hypolipidemic and antioxidant effects of the juice and water seed extracts of two pomegranate species in high-cholesterol diet fed rats. *Food Science and Technology*, 2061, 1–9.
- Biswas, A., Oh, P. I., Faulkner, G. E., Bajaj, R. R., Silver, M. A., Mitchell, M. S., & Alter, D. A. (2015). Sedentary time and its association with risk for disease incidence, mortality, and hospitalization in adults a systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, 162(2), 123–132.
- Bitzur, R., Cohen, H., Kamari, Y., & Harats, D. (2013). Intolerance to statins: Mechanisms and management. *Diabetes Care*, 36(2), 325–330.
- Bonizzi, A., Piuri, G., Corsi, F., Cazzola, R., & Mazzucchelli, S. (2021). HDL Dysfunctionality : Clinical Relevance of Quality Rather Than Quantity. *Biomedicines*, 9(729), 1–14.
- Bonneville, J. (2018). *Effets athéroprotecteurs de la curcumine et d'extraits riches en polyphénols d'Antirhea borbonica et de Doratoxylon apetalum*.
- Borén, J., John Chapman, M., Krauss, R. M., Packard, C. J., Bentzon, J. F., Binder, C. J., Daemen, M. J., Demer, L. L., Hegele, R. A., Nicholls, S. J., Nordestgaard, B. G., Watts, G. F., Bruckert, E., Fazio, S., Ference, B. A., Graham, I., Horton, J. D., Landmesser, U., Laufs, U., ... Ginsberg, H. N. (2020). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel Translational medicine. *European Heart Journal*, 41, 2314–2331.
- Borowczyk, C. (2021). *Développement d'un modèle physiopathologique de macrophages spumeux de l'athérosclérose : caractérisation phénotypique et fonctionnelle et sélection d'anticorps humains spécifiques*.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1931–1937.
- Bouguerne, B. (2012). *Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis de maladies cardiovasculaires (athérosclérose)*.
- Bouhlali, E. dine T., Hmidani, A., Bourkhis, B., Khouya, T., Harnafi, H., Filali-Zegzouti, Y., & Alem, C. (2020). Effect of Phoenix dactylifera seeds (dates) extract in triton WR-1339 and high fat diet induced hyperlipidaemia in rats: A comparison with simvastatin. *Journal of Ethnopharmacology*, 259, 1–10.
- Boussaa, F., Zaouay, F., Burlo-Carbonell, F., Nuncio-Jáuregui, N., Gmati, M., El Arbi, B., Melgarejo, P., Hernandez, F., & Mars, M. (2019). Combined effects of cropping system and harvest date determine quality and nutritional value of pomegranate fruits (*Punica granatum* L. cv. Gabsi). *Scientia Horticulturae*, 249(August 2018), 419–431.
- Boutin, V., Geray, L., Krauss, Y., & ViLBert, C. (2015). Atlas de Biologie. In *Atlas de biologie . Paris: Dunod* (p. 26_30).
- Bradford, M. M. (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.
- Brown, B. A., Williams, H., & George, S. J. (2017). Evidence for the Involvement of Matrix-Degrading Metalloproteinases (MMPs) in Atherosclerosis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 147, 197–237.
- Brown, J. C., Gerhardt, T. E., & Kwon, E. (2020). *Risk Factors For Coronary Artery Disease - PubMed*. StatPearls.
- Bujold, K. (2011). *Régulation du métabolisme et du transport des lipides dans les macrophages : potentiel anti-athérosclérotique des ligands du CD36*.
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 25(3), 287–299.
- Cai, Y., Xing, G., Shen, T., Zhang, S., Rao, J., & Shi, R. (2017). Effects of 12-week supplementation of Citrus bergamia extracts-based formulation CitriCholes on cholesterol and body weight in older adults with dyslipidemia : a controlled trial. *Lipids in Health and Disease*, 16(251), 1–13.
- Caliskan, O., & Bayazit, S. (2013). Morpho-pomological and chemical diversity of pomegranate accessions grown in Eastern Mediterranean region of Turkey. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1449–1460.
- Caliskan, Oguzhan, & Bayazit, S. (2012). Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates. *Scientia Horticulturae*, 147, 81–88.
- Çam, M., & Hişil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3), 878–885.
- Cammisotto, V., Nocella, C., Bartimoccia, S., Sanguigni, V., Francomano, D., Sciarretta, S., Pastori, D., Peruzzi, M., Cavarretta, E., D’amico, A., Castellani, V., Frati, G., Carnevale, R., & Group, S. (2021). The role of antioxidants supplementation in clinical practice: focus on cardiovascular risk factors. *Antioxidants*, 10(2), 1–32.
- Cao, K., Xu, J., Pu, W., Dong, Z., Sun, L., Zang, W., Gao, F., Zhang, Y., Feng, Z., & Liu, J. (2015). Punicalagin, an active component in pomegranate, ameliorates cardiac mitochondrial impairment in obese rats via AMPK activation. *Scientific Reports*, 5, 1–12.
- Capurso, A., Crepaldi, G., & Capurso, C. (2018). *Benefits of the Mediterranean Diet in the Elderly Patient*.
- Carnevale, R., Loffredo, L., Pignatelli, P., Nocella, C., Bartimoccia, S., di Santo, S., Martino, F., Catasca, E., Perri, L., & Violi, F. (2012). Dark chocolate inhibits platelet isoprostanes via NOX2 down-regulation in smokers. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(1), 125–132.
- Carreres, L., Jílková, Z. M., Vial, G., Marche, P. N., Decaens, T., & Lerat, H. (2021). Modeling diet-induced nafld and nash in rats: A comprehensive review. *Biomedicines*, 9(4), 1–16.
- Caruso, A., Barbarossa, A., Tassone, A., Ceramella, J., Carocci, A., Catalano, A., Basile, G., Fazio, A., Iacopetta, D., Franchini, C., & Sinicropi, M. S. (2020). Pomegranate: Nutraceutical with promising benefits on human health. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(19), 1–34.
- Cassagnol, A. B. B. M. (2021). *HMG-CoA Reductase Inhibitors - StatPearls - NCBI Bookshelf*. StatPearl.
- Castronovo, L. M., Vassallo, A., Mengoni, A., Miceli, E., Bogani, P., Firenzuoli, F., Fani, R., & Maggini, V. (2021). Medicinal plants and their bacterial microbiota: A review on antimicrobial compounds production for plant and human health. *Pathogens*, 10(2), 1–17.
- Catapano, A. L., Tokgözoğlu, L., Mello e Silva, A., & Bruckert, E. (2019). Pharmaceutical strategies for reducing LDL-C and risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis: X*, 1, 1–5.
- Čejková, S., Králová-Lesná, I., & Poledne, R. (2016). Monocyte adhesion to the endothelium is an initial stage of atherosclerosis development. *Cor et Vasa*, 58(4), e419–e425.
- Cerdá, B., Cerón, J. J., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2003). Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3493–3501.
- Chaachouay, N., Benkhiguel, O., Fadli, M., El Ayadi, R., & Zidane, L. (2019). Ethnobotanical study of medicinal plants used to treat osteoarticular diseases in the Moroccan Rif, Morocco. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 7(6), 454–470.

- Chaachouay, N., Douira, A., & Zidane, L. (2021). Herbal Medicine Used in the Treatment of Human Diseases in the Rif, Northern Morocco. *Arabian Journal for Science and Engineering*.
- Chaitra, H. R., Madhuri, M., Nishitha, S. T., Arijit, D., Sourav, B., & Rohit, K. C. (2012). Evaluation of Antimicrobial Properties, Phytochemical Contents and Antioxidant Capacities of Leaf Extracts of *Punica granatum* L. *Journal of Biological Sciences*, 1(2), 32–37.
- Chang, X., Zhang, T., Zhang, W., Zhao, Z., & Sun, J. (2020). Natural Drugs as a Treatment Strategy for Cardiovascular Disease through the Regulation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–20.
- Chebaibi, A., & Filali, F. R. (2013). Bactericidal activity and phytochemical screening of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel aqueous extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(14), 887–891.
- Checkouri, E., Blanchard, V., & Meilhac, O. (2021). Macrophages in atherosclerosis, first or second row players? *Biomedicines*, 9(9), 1–31.
- Chen, J. H., Lee, M. S., Wang, C. P., Hsu, C. C., & Lin, H. H. (2017). Autophagic effects of Hibiscus sabdariffa leaf polyphenols and epicatechin gallate (ECG) against oxidized LDL-induced injury of human endothelial cells. *European Journal of Nutrition*, 56(5), 1963–1981.
- Chen, J. yi, Ye, Z. xin, Wang, X. fen, Chang, J., Yang, M. wen, Zhong, H. hua, Hong, F. fang, & Yang, S. long. (2018). Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97(October 2017), 423–428.
- Chen, Y., Zeng, Y., Zhu, X., Miao, L., Liang, X., Duan, J., Li, H., Tian, X., Pang, L., Wei, Y., & Yang, J. (2021). Significant difference between sirolimus and paclitaxel nanoparticles in anti-proliferation effect in normoxia and hypoxia: The basis of better selection of atherosclerosis treatment. *Bioactive Materials*, 6(3), 880–889.
- Cheng, Y. C., Sheen, J. M., Hu, W. L., & Hung, Y. C. (2017). Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–16.
- Chia, P. Y., Teo, A., & Yeo, T. W. (2020). Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans. *Frontiers in Medicine*, 7, 1–15.
- Chiesa, S. T., & Charakida, M. (2019). High-Density Lipoprotein Function and Dysfunction in Health and Disease. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 33, 207–219.
- Chistiakov, D. A., Kashirskikh, D. A., Khotina, V. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N. (2019). Immune-Inflammatory Responses in Atherosclerosis: The Role of Myeloid Cells. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1798.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2015). Endothelial barrier and its abnormalities in cardiovascular disease. *Frontiers in Physiology*, 6, 1–11.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). Endothelial PECAM-1 and its function in vascular physiology and atherogenic pathology. *Experimental and Molecular Pathology*, 100(3), 409–415.
- Choudhury, S., Ghosh, S., Mukherjee, S., Gupta, P., Bhattacharya, S., Adhikary, A., & Chattopadhyay, S. (2016). Pomegranate protects against arsenic-induced p53-dependent ROS-mediated inflammation and apoptosis in liver cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 38, 25–40.
- Chtourou, Y., Slima, A. Ben, Makni, M., Gdoura, R., & Fetoui, H. (2015). Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats. *Pharmacological Reports*, 67(6), 1090–1097.
- Cismaru, G., Serban, T., & Tirpe, A. (2021). Ultrasound methods in the evaluation of atherosclerosis: From pathophysiology to clinic. *Biomedicines*, 9(4), 1–22.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1118–1125.
- Connelly, P. W., & Hegele, R. A. (1998). Hepatic Lipase Deficiency *. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 35(6), 547–572.
- Coronado-reyes, J. A., Cortés-penagos, C. D. J., & González-hernández, J. C. (2021). Chemical

- composition and great applications to the fruit of the pomegranate (*Punica granatum*): a review. *Food Science and Technology*, 2061, 1–8.
- Csonka, C., Sárközy, M., Pipicz, M., Dux, L., & Csont, T. (2016). Modulation of hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress in the heart. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–23.
- Cullen, A. E., Centner, A. M., Deitado, R., Fernandez, J., & Salazar, G. (2020). The impact of dietary supplementation of whole foods and polyphenols on atherosclerosis. *Nutrients*, 12(7), 1–36.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 348–361.
- Da Porto, A., Cavarape, A., Colussi, G., Casarsa, V., Catena, C., & Sechi, L. A. (2021). Polyphenols rich diets and risk of type 2 diabetes. *Nutrients*, 13(5), 1–11.
- da Silva, J. S., Montagnoli, T. L., Rocha, B. S., Tacco, M. L. C. A., Marinho, S. C. P., & Zapata-Sudo, G. (2021). Estrogen receptors: Therapeutic perspectives for the treatment of cardiac dysfunction after myocardial infarction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–20.
- Daiber, A., Hahad, O., Andreadou, I., Steven, S., Daub, S., & Münzel, T. (2021). Redox-related biomarkers in human cardiovascular disease - classical footprints and beyond. *Redox Biology*, 42, 1–21.
- Daiber, A., Xia, N., Steven, S., Oelze, M., Hanf, A., Kröller-schön, S., Münzel, T., & Li, H. (2019). New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function / Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.*, 20(1), 187.
- Dangles, O. (2012). Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 692–714.
- Das, A. K., Mandal, S. C., Banerjee, S. K., Sinha, S., Das, J., Saha, B. P., & Pal, M. (1999). Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 205–208.
- Das, N., Goshwami, D., Hasan, M. S., & Raihan, S. Z. (2015). Evaluation of acute and subacute toxicity induced by methanol extract of *Terminalia citrina* leaves in Sprague Dawley rats. *Journal of Acute Disease*, 4(4), 316–321.
- DaSilva, N. A., Nahar, P. P., Ma, H., Eid, A., Wei, Z., Meschwitz, S., Zawia, N. H., Slitt, A. L., & Seeram, N. P. (2019). Pomegranate ellagitannin-gut microbial-derived metabolites, urolithins, inhibit neuroinflammation in vitro. *Nutritional Neuroscience*, 22(3), 185–195.
- Davidson, S. M., & Duchon, M. R. (2007). Endothelial mitochondria: Contributing to vascular function and disease. *Circulation Research*, 100(8), 1128–1141.
- de Boer, J. F., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2018). Cholesterol Transport Revisited: A New Turbo Mechanism to Drive Cholesterol Excretion. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(2), 123–133.
- De Paoli, M., Zakharia, A., & Werstuck, G. H. (2021). The role of estrogen in insulin resistance: a review of clinical and pre-clinical data. *The American Journal of Pathology*, 21.
- Dehelean, C. A., Marcovici, I., Soica, C., Mioc, M., Coricovac, D., Iurciuc, S., Cretu, O. M., & Pinzaru, I. (2021). Plant-Derived Anticancer Compounds as New Perspectives in Drug Discovery and Alternative Therapy. *Molecules*, 26(1109), 1–29.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892.
- Dell'Agli, M., Buscialà, A., & Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, 63(4), 593–602.
- Dell'Agli, M., Galli, G. V., Corbett, Y., Taramelli, D., Lucantoni, L., Habluetzel, A., Maschi, O., Caruso, D., Giavarini, F., Romeo, S., Bhattacharya, D., & Bosisio, E. (2009). *Antiplasmodial activity of Punica granatum L . fruit rind*. 125, 279–285.
- Deng, Y., Li, Y., Yang, F., Zeng, A., Yang, S., Luo, Y., Zhang, Y., Xie, Y., Ye, T., Xia, Y., & Yin, W. (2017).

- The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 976–984.
- Deore Leena, P., Bachhav Devidas, G., Nikam Vikas, K., & Heda Amol, J. (2016). Study of Anthelmintic and Antimicrobial Activity of Peel Extract of *Punica Granatum* Linn. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(4), 292–297.
- Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., Hosseini, M. S., Conti, G. O., & Sadrabad, E. K. (2018). Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 108–111.
- Descamps, E., Gele, P., Bordet, R., & Vamecq, J. (2006). Pharmacological control of oxidative stress. *Lettre Du Pharmacologue*, 20(4), 107–118.
- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., & Restani, P. (2021). Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 13(1), 1–30.
- Di Pietro, N., Baldassarre, M. P. A., Cichelli, A., Pandolfi, A., Formoso, G., & Pipino, C. (2020). Role of Polyphenols and Carotenoids in Endothelial Dysfunction: An Overview from Classic to Innovative Biomarkers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–19.
- Di Stefano, V., Pitonzo, R., Novara, M. E., Bongiorno, D., Indelicato, S., Gentile, C., Avellone, G., Bognanni, R., Scandurra, S., & Melilli, M. G. (2019). Antioxidant activity and phenolic composition in pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes from south Italy by UHPLC–Orbitrap-MS approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1038–1045.
- Díaz-Mula, H. M., Tomás-Barberán, F. A., & García-Villalba, R. (2019). Pomegranate Fruit and Juice (cv. Mollar), Rich in Ellagitannins and Anthocyanins, Also Provide a Significant Content of a Wide Range of Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(33), 9160–9167.
- Dorantes-Morales, A., Estrada-Luna, D., Bautista-Pérez, R., Betanzos-Cabrera, G., Luna-Luna, M., Flores-Castillo, C., Vargas-Alarcón, G., Fragoso, J. M., Pérez-Méndez, Ó., & Carreón-Torres, E. (2020). Microencapsulated Pomegranate Modifies the Composition and Function of High-Density Lipoproteins (HDL) in New Zealand Rabbits. *Molecules*, 25(3297), 1–15.
- Du, C., Shi, Y., Ren, Y., Wu, H., Yao, F., Wei, J., Wu, M., Hou, Y., & Duan, H. (2015). Anthocyanins inhibit high-glucose-induced cholesterol accumulation and inflammation by activating LXR α pathway in HK-2 cells. *Drug Des Devel Ther*, 9, 5099–5113.
- Dugi, K. A., Brandauer, K., Schmidt, N., Nau, B., Schneider, J. G., Mentz, S., Keiper, T., Schaefer, J. R., Meissner, C., Kather, H., Bahner, M. L., Fiehn, W., & Kreuzer, J. (2001). Low Hepatic Lipase Activity Is a Novel Risk Factor for Coronary Artery Disease. *Circulation*, 104(25), 3057–3062.
- Duraipandiyar, V., Al-dhabi, N. A., Stephen, S., & Sunil, C. (2016). Hypolipidemic activity of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* in hyperlipidemic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 89–93.
- Durgaç, C., Özgen, M., Şimşek, Ö., Kaçar, Y. A., Kiyga, Y., Çelebi, S., Gündüz, K., & Serçe, S. (2008). Molecular and pomological diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 7(9), 1294–1301.
- Dutok, C. M. S., Berenguer-Rivas, C. A., Rodríguez-Leblanch, E., Pérez-Jackson, L., Chil-Nuñez, I., Escalona-Arranz, J. C., Reyes-Tur, B., & Queiroz, M. M. C. (2015). Acute toxicity and dermal and eye irritation of the aqueous and hydroalcoholic extracts of the seeds of “zapote” *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist. *Scientific World Journal*, 2015.
- Ekşi, A., & Özhamamcı, İ. (2009). Chemical Composition and Guide Values of Pomegranate Juice. *Journal of Food*, 34(5), 265–270.
- El Deeb, K. S., Eid, H. H., Ali, Z. Y., Shams, M. M., & Elfiky, A. M. (2021). Bioassay-guided fractionation and identification of antidiabetic compounds from the rind of *Punica Granatum* Var. nana. *Natural Product Research*, 35(12), 2103–2106.
- El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Zerrouki, A., Cherrah, Y., & Alaoui, K. (2016). Radical-Scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Advances in Pharmacological Sciences*, 2016, 2–3.
- El moujahed, S., Chahdi, F. O., Rodi, Y. K., El ghadraoui, L., Lemjallad, L., & Errachidi, F. (2021). The

- Moroccan Pomegranate: An Underrated Source of Tannins Extracts and Natural Antimicrobials from Juice Processing Byproducts. *Waste and Biomass Valorization*, 12(10), 5383–5399.
- Elahi, M. M., Cagampang, F. R., Mukhtar, D., Anthony, F. W., Ohri, S. K., & Hanson, M. A. (2009). Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *British Journal of Nutrition*, 102, 514–519.
- Elaleem, H. G. A., Albasheer, A. A., & Elaleem, K. G. A. (2016). Global Journal of Medicinal Plant Research: Herbal Remedies Used in the Treatment of Scorpion Stings in Saudi Arabia. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 4(4), 9–15.
- Elango, S., Balwas, R., & Padma, V. V. (2011). Gallic Acid Isolated from Pomegranate Peel Extract Induces Reactive Oxygen Species Mediated Apoptosis in A549 Cell Line. *Journal of Cancer Therapy*, 2, 638–645.
- Elbandy, M., & Ashoush, I. S. (2012). Phytochemicals in Pomegranate Seeds and Their Effect as Hypolipidemic Agent in Hypercholesterolemic Rats. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 7(1), 85–92.
- Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., & Ferchichi, A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(32), 4724–4730.
- Elmastaş, M., Gülçin, I., İşildak, Ö., Küfrevioğlu, Ö. I., Ibaoglu, K., & Aboul-Enein, H. Y. (2006). Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3(3), 258–266.
- Elshafie, H. S., Caputo, L., De Martino, L., Sakr, S. H., De Feo, V., & Camele, I. (2021). Study of bio-pharmaceutical and antimicrobial properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) leathery exocarp extract. *Plants*, 10(1), 1–9.
- Engler, M. B., Engler, M. M., Browne, A., Chiu, E. Y., Mietus-Snyder, M. L., Paul, S. M., Malloy, M. J., Chen, C. Y., Kwak, H. K., Milbury, P., & Blumberg, J. (2004). Flavonoid-Rich Dark Chocolate Improves Endothelial Function and Increases Plasma Epicatechin Concentrations in Healthy Adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(3), 197–204.
- Escarcega, G. H., Sánchez-chávez, E., Pérez, S., Caballero, M. S., Manuel, J., Parra, S., Antonia, M., Aideé, N., Salazar, S., Barrios, D. L. O., Caballero, M. S., Manuel, J., Parra, S., Flores-córdova, M. A., Sánchez-chávez, E., Pérez, S., Caballero, M. S., Manuel, J., Parra, S., ... Salas, N. A. (2020). Determination of antioxidant phenolic, nutritional quality and volatiles in pomegranates (*Punica granatum* L.) cultivated in Mexico. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 979–991.
- Esmailzadeh, A., Tahbaz, F., Gaieni, I., Alavi-majd, H., & Azadbakht, L. (2006). Cholesterol-Lowering Effect of Concentrated Pomegranate Juice Consumption in Type II Diabetic Patients with Hyperlipidemia. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 76(3), 147–151.
- Esposito, S., Veneziani, G., Taticchi, A., Urbani, S., Selvaggini, R., Sordini, B., Daidone, L., Gironi, G., & Servili, M. (2021). Chemical composition, antioxidant activity, and sensory characterization of commercial pomegranate juices. *Antioxidants*, 10(9), 1–25.
- Estrada-Luna, D., Hinojosa, E. M., Diaz, J. C. C., Miller, H. B., López-Rodríguez, G., & Betanzos-Cabrera, G. (2017). Daily supplementation with fresh pomegranate juice increases paraoxonase 1 expression and activity in mice fed a high-fat diet. *European Journal of Nutrition*, 57, 383–389.
- Estrada-Luna, Diego, Carreón-Torres, E., Bautista-Pérez, R., Betanzos-Cabrera, G., Dorantes-Morales, A., Luna-Luna, M., Vargas-Barrón, J., Mejía, A. M., Fragoso, J. M., Carvajal-Aguilera, K., García-Trejo, J. J., Vargas-Alarcón, G., & Pérez-Méndez, Ó. (2019). Microencapsulated Pomegranate Reverts High-Density Lipoprotein (HDL)-Induced Endothelial Dysfunction and Reduces Postprandial Triglyceridemia in Women with Acute Coronary Syndrome. *Nutrients*, 11, 1710.
- Faggio, C., Sureda, A., Morabito, S., Sanches-Silva, A., Mocan, A., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *European Journal of Pharmacology*, 807(October 2016), 91–101.

- Frag, R. S., Abdel-Latif, M. S., Abd El Baky, H. H., & Tawfeek, L. S. (2020). Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. *Biotechnology Reports*, 28, 1–7.
- Faria, A., & Conceição, C. (2011). The bioactivity of pomegranate: Impact on health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 626–634.
- Farrell, N., Norris, G., Lee, S. G., Chun, O. K., & Blesso, C. N. (2015). Anthocyanin-rich black elderberry extract improves markers of HDL function and reduces aortic cholesterol in hyperlipidemic mice. *Food Funct*, 6(4), 1278–1287.
- Fatiha, B. A., Ouafae, B., Souad, S., Fatima, E. H., Jamila, D., Allal, D., & Lahcen, Z. (2017). Ethnobotany Study of Medicinal Plants Used in the Treatment of Respiratory Diseases in the Middle Region of Oum Rbai. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(4), 1460–1468.
- Fatope, M. O., Al Burtomani, S. K. S., & Takeda, Y. (2002). Monoacylglycerol from Punica granatum seed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 357–360.
- Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2013). Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. 'Bhagwa'). *South African Journal of Botany*, 85(March), 23–31.
- Feldman, F., Koudoufio, M., Desjardins, Y., Spahis, S., Delvin, E., & Levy, E. (2021). Efficacy of polyphenols in the management of dyslipidemia: A focus on clinical studies. *Nutrients*, 13(2), 1–42.
- Fernandes, L., Pereira, J. A., Lopéz-Cortés, I., Salazar, D. M., González-Álvarez, J., & Ramalhosa, E. (2017). Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1799–1814.
- Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C., & Noel, J. P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 356–370.
- Finegold, S. M., Summanen, P. H., Corbett, K., Downes, J., Henning, S. M., & Li, Z. (2014). Pomegranate extract exhibits invitro activity against *Clostridium difficile*. *Nutrition*, 30(10), 1210–1212.
- Fischer, Ulrike A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chemistry*, 127(2), 807–821.
- Fischer, Ulrike Anna, Jaksch, A. V., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012). Determination of lignans in edible and nonedible parts of pomegranate (*Punica granatum* L.) and products derived therefrom, particularly focusing on the quantitation of isolariciresinol using HPLC-DAD-ESI/MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 283–292.
- Flammer, A. J., Anderson, T., Celermajer, D. S., Creager, M. A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N. M., Lüscher, T. F., Shechter, M., Taddei, S., Vita, J. A., & Lerman, A. (2012). The assessment of endothelial function: From research into clinical practice. *Circulation*, 126(6), 753–767.
- Fledderus, J., Vanchin, B., Rots, M. G., & Krenning, G. (2021). The endothelium as a target for anti-atherogenic therapy: A focus on the epigenetic enzymes EZH2 and sirt1. *Journal of Personalized Medicine*, 11(2), 1–21.
- Flynn, M. C., Pernes, G., Lee, M. K. S., Nagareddy, P. R., & Murphy, A. J. (2019). Monocytes, Macrophages, and Metabolic Disease in Atherosclerosis. *Front Pharmacol*, 10, 1–13.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., E., J., & Kinsella. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341, 454–457.
- Frégeau, G. (2020). Étude des effets anti-athérosclérotiques d'analogues aza-GHRP-6 en tant que ligands du récepteur CD36 chez un modèle murin déficient en apolipoprotéine E.
- Friedman, M., & Boyers, S. (1953). The mechanism responsible for the hypercholesteremia induced by Triton WR-1339. *J. Exp. Med*, 97, 117–130.
- Fuchs, F. D., & Whelton, P. K. (2020). High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension*,

- Cvd*, 285–292.
- Fuhrman, B., Volkova, N., & Michael Aviram, T. (2005). Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*, 570–576.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(12), 1752–1761.
- Fuster-Muñoz, E., Roche, E., Funes, L., Martínez-Peinado, P., Sempere, J. M., & Vicente-Salar, N. (2016). Effects of pomegranate juice in circulating parameters, cytokines, and oxidative stress markers in endurance-based athletes: A randomized controlled trial. *Nutrition*, *32*(5), 539–545.
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–34.
- Gao, Q., Wei, A., Chen, F., Chen, X., Ding, W., Ding, Z., Wu, Z., Du, R., & Cao, W. (2020). Enhancing PPAR γ by HDAC inhibition reduces foam cell formation and atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Pharmacological Research*, *160*, 1–28.
- García, P., Fredes, C., Cea, I., Lozano-Sánchez, J., Leyva-Jiménez, F. J., Robert, P., Vergara, C., & Jimenez, P. (2021). Recovery of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel using pressurized liquid extraction. *Foods*, *10*(2), 1–17.
- Garima, P., & Akoh, C. C. (2009). Antioxidant capacity and lipid characterization of six georgia-grown pomegranate cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(20), 9427–9436.
- Gąsecka, A., Rogula, S., Szarpak, Ł., & Filipiak, K. J. (2021). LDL-cholesterol and platelets: Insights into their interactions in atherosclerosis. *Life*, *11*(1), 1–13.
- Gautam, R. K., Sharma, S., Sharma, K., & Gupta, G. (2018). Evaluation of antiarthritic activity of butanol fraction of *Punica granatum* linn. Rind extract against freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, *37*(1), 53–62.
- Gayathri, V., Ananthi, S., & Vasanthi, H. R. (2013). Antihyperlipidemic potential of polyphenol and glycoside rich nerium oleander flower against triton WR-1339-induced hyperlipidemia in experimental sprague dawley rats. *Journal of Chemistry*, *2013*, 1–18.
- Gencer, S., Evans, B. R., Van Der Vorst, E. P. C., Döring, Y., & Weber, C. (2021). Inflammatory chemokines in atherosclerosis. *Cells*, *10*(2), 1–26.
- George, N. S., Cheung, L., Luthria, D. L., Santin, M., Dawson, H. D., Bhagwat, A. A., & Smith, A. D. (2019). Pomegranate peel extract alters the microbiome in mice and dysbiosis caused by *Citrobacter rodentium* infection. *Food Science and Nutrition*, *7*(8), 2565–2576.
- Ghadge, K. S., & Jadhav, B. D. (2015). Research Article Physico-chemical properties , estimation of total sugars and vitamin C content of pomegranate cultivars Arakta and Gansesh : A comparative investigation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *7*(8), 670–675.
- Ghimire, A., Paudel, N., & Poudel, R. (2021). Effect of pomegranate peel extract on the storage stability of ground buffalo (*Bubalus bubalis*) meat. *Lwt*, *154*, 1–9.
- Gianazza, E., Brioschi, M., Fernandez, A. M., & Banfi, C. (2019). Lipoxidation in cardiovascular diseases. *Redox Biology*, *23*, 1–22.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(10), 4581–4589.
- Giménez-Bastida, J. A., Ávila-Gálvez, M. Á., Espín, J. C., & González-Sarrías, A. (2021). Evidence for health properties of pomegranate juices and extracts beyond nutrition: A critical systematic review of human studies. *Trends in Food Science and Technology*, *114*, 410–423.
- Godos, J., Vitale, M., Micek, A., Ray, S., Martini, D., Del Rio, D., Riccardi, G., Galvano, F., & Grosso, G. (2019). Dietary polyphenol intake, blood pressure, and hypertension: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Antioxidants*, *8*(6), 1–21.

- Goldfarb, S. (1978). Rapid increase in hepatic HMG CoA reductase activity and in vivo cholesterol synthesis after Triton WR 1339 injection. *Journal of Lipid Research*, 19(4), 489–494.
- Goyal, A., & Zeltser, R. (2021). Unstable Angina. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442000/>
- Grabež, M., Škrbić, R., Stojiljković, M. P., Rudić-Grujić, V., Paunović, M., Arsić, A., Petrović, S., Vučić, V., Mirjanić-Azarić, B., Šavikin, K., Menković, N., Janković, T., & Vasiljević, N. (2019). Beneficial effects of pomegranate peel extract on plasma lipid profile, fatty acids levels and blood pressure in patients with diabetes mellitus type-2: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Functional Foods*, 64.
- Gradinaru, D., Borsa, C., Ionescu, C., & Prada, G. I. (2015). Oxidized LDL and NO synthesis-Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 151, 101–113.
- Gregersen, I., Høibraaten, E., Holven, K. B., Løvdahl, L., Ueland, T., Mowinckel, M. C., Dahl, T. B., Aukrust, P., Halvorsen, B., & Sandset, P. M. (2019). Effect of hormone replacement therapy on atherogenic lipid profile in postmenopausal women. *Thrombosis Research*, 184(October), 1–7.
- Guerrero-Solano, J. A., Jaramillo-Morales, O. A., Velázquez-González, C., De la O-Arciniega, M., Castañeda-Ovando, A., Betanzos-Cabrera, G., & Bautista, M. (2020). Pomegranate as a potential alternative of pain management: A review. *Plants*, 9(4), 1–18.
- Guevara-Cruz, M., Medina-Vera, I., Cu-Cañetas, T. E., Cordero-Chan, Y., Torres, N., Tovar, A. R., Márquez-Mota, C., Talamantes-Gómez, J. M., Pérez-Monter, C., Lugo, R., Gutiérrez-Solis, A. L., & Avila-Nava, A. (2021). Chaya Leaf Decreased Triglycerides and Improved Oxidative Stress in Subjects With Dyslipidemia. *Frontiers in Nutrition*, 8, 1–9.
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sciences*, 78(8), 803–811.
- Gülçin, I., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43–53.
- Guo, S., Deng, Q., Xiao, J., Xie, B., & Sun, Z. (2007). Evaluation of antioxidant activity and preventing DNA damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3134–3140.
- Hadi, H. A. R., Carr, C. S., & Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular Health and Risk Management*, 1(3), 183–198.
- Hadjadj, S., Benyahkem, M., Lamri, K., & Ould El Hadj-Khelil, A. (2018). Potential Assessment Of Pomegranate (*Punica Granatum L.*) Fruit Peels As A Source Of Natural Antioxidants. *Pharmacophore*, 9(4), 29–35.
- Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1989). Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1), 347–369.
- Han, H., Dai, D., Wang, W., Zhu, J., Zhu, Z., Lu, L., & Zhang, R. (2019). Impact of serum levels of lipoprotein lipase, hepatic lipase, and endothelial lipase on the progression of coronary artery disease. *Journal of Interventional Medicine*, 2(1), 16–20.
- Hap, K., Biernat, K., & Konieczny, G. (2021). Patients with Diabetes Complicated by Peripheral Artery Disease: the Current State of Knowledge on Physiotherapy Interventions. *Journal of Diabetes Research*, 2021, 1–12.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3 Rd Edition, Chapman and Hall. New York.
- Hardy, L. (2019). *Identification de Nouveaux Acteurs du Métabolisme des HDL/ Impact sur les Maladies Cardiovasculaires*.
- Harnafi, H., Serghini Caid, H., el Houda Bouanani, N., Aziz, M., & Amrani, S. (2008). Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chemistry*, 108(1), 205–212.
- Harnafi, M., Touiss, I., Khatib, S., Bekkouch, O., & Harnafi, H. (2018). Pomegranate Peels Extract Improves Plasma Lipid Profiles in Triton-WR-1339-Induced Hyperlipidemic Mice and Attenuates Lipoprotein Oxidation. *American Journal of Food Science and Nutrition*, 5(3), 58–65.
- Hasan, A. M., Redha, A. A., & Mandeel, Q. (2018). Phytochemical Investigations of Pomegranate

- (*Punica granatum*) Rind and Aril Extracts and their Antioxidant, Antidiabetic and Antibacterial Activity. *Natural Products Chemistry & Research*, 6(4), 1–10.
- Hasib, A., Rashad, V., Iqbal, A., & Nisar, N. (2017). Evaluation of unexplored pomegranate cultivars for physicochemical characteristics and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2973–2979.
- Hassan, N. F., Soliman, G. M., Okasha, E. F., & Shalaby, A. M. (2018). Histological, Immunohistochemical, and Biochemical Study of Experimentally Induced Fatty Liver in Adult Male Albino Rat and the Possible Protective Role of Pomegranate. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 6(1), 44–55.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 96).
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513.
- Herbert C. Stary, MD, C., A. Blealdehy Chandler, M., Seymour Glagov, M., John R. Guyton, M., William Insull, Jr, M., Michael E. Rosenfeld, P., Sheldon A. Schaffer, P., Colin J. Schwartz, M., William D. Wagner, P., & Robert W. Wissler, M. (1994). A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89(4), 2462–2478.
- Hmid, I. (2013). *Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (Punica Granatum L.) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais*. 175.
- Hmid, I., Elothmani, D., Hanine, H., Oukabli, A., & Mehinagic, E. (2013). Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 2675–2684.
- Hmid, I., Hanine, H., Elothmani, D., & Oukabli, A. (2018). The physico-chemical characteristics of Moroccan pomegranate and evaluation of the antioxidant activity for their juices. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(3), 302–309.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604–611.
- Hoensch, H. P., & Oertel, R. (2015). The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clinical Nutrition Experimental*, 3, 8–14.
- Hopkins, P. N. (2013). Molecular biology of atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 93(3), 1317–1542.
- Hossaini Nasr, S., & Huang, X. (2021). Nanotechnology for Targeted Therapy of Atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 1–12.
- Hosseini, B., Saedisomeolia, A., Wood, L. G., Yaseri, M., & Tavasoli, S. (2016). Effects of pomegranate extract supplementation on inflammation in overweight and obese individuals: A randomized controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 22, 44–50.
- Hou, C., Zhang, W., Li, J., Du, L., Lv, O., Zhao, S., & Li, J. (2019). Beneficial Effects of Pomegranate on Lipid Metabolism in Metabolic Disorders. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63(16), 1–12.
- Hrelia, S., & Angeloni, C. (2020). New mechanisms of action of natural antioxidants in health and disease. *Antioxidants*, 9(4), 1–5.
- Hutchins, P. M., & Heinecke, J. W. (2016). Cholesterol Efflux Capacity, Macrophage Reverse Cholesterol Transport, and Cardioprotective HDL. *Curr Opin Lipidol*, 26(5), 388–393.
- Ibrahim, N. I., & Mohamed, I. N. (2021). Interdependence of anti-inflammatory and antioxidant properties of squalene—implication for cardiovascular health. *Life*, 11(2), 1–19.
- Ihle-Hansen, H., Ihle-Hansen, H., Sandset, E. C., & Hagberg, G. (2021). Subclinical Carotid Artery Atherosclerosis and Cognitive Function: A Mini-Review. *Frontiers in Neurology*, 12, 1–7.
- Ikhlef, S., Berrougui, H., Simo, O. K., Zerif, E., & Khalil, A. (2017). Human paraoxonase 1 overexpression in mice stimulates HDL cholesterol efflux and reverse cholesterol transport.

- PLoS ONE*, 12(3), 1–18.
- Iqbal, S., Bhanger, M. I., & Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, 93(2), 265–272.
- Islam, S. U., Ahmed, M. B., & Ahsan, H. (2021). Recent Molecular Mechanisms and Beneficial Effects of Phytochemicals and Plant-Based Whole Foods in Reducing LDL-C and Preventing Cardiovascular Disease. *Antioxidants*, 10(784), 1–28.
- Ismail, F. A., Abdelatif, S. H., El-Mohsen, N. R. A., & Zaki, S. A. (2014). The Physico-Chemical Properties of Pomegranate Juice (*Punica granatum L.*) Extracted From Two Egyptian Varieties. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 9(1), 29–35.
- Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 397–405.
- Ito, H., Li, P., Koreishi, M., Nagatomo, A., Nishida, N., & Yoshida, T. (2014). Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products. *Food Chemistry*, 152, 323–330.
- Iwatake, M., Okamoto, K., Tanaka, T., & Tsukuba, T. (2015). Punicalagin attenuates osteoclast differentiation by impairing NFATc1 expression and blocking Akt- and JNK-dependent pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 407(1–2), 161–172.
- Izzo, C., Vitillo, P., Di Pietro, P., Visco, V., Strianese, A., Virtuoso, N., Ciccarelli, M., Galasso, G., Carrizzo, A., & Vecchione, C. (2021). The role of oxidative stress in cardiovascular aging and cardiovascular diseases. *Life*, 11(1), 1–42.
- Jansen, H., Verhoeven, A. J. M., & Sijbrands, E. J. G. (2002). Hepatic lipase : a pro- or anti-atherogenic protein ? *J Lipid Res*, 43(9), 1352–1362.
- Jaouad, L., De Guise, C., Berrougui, H., Cloutier, M., Isabelle, M., Fulop, T., Payette, H., & Khalil, A. (2006). Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis*, 185(1), 191–200.
- Jayaprakasha, G. K., & Jaganmohan Rao, L. (2000). Phenolic constituents from the lichen *parmotrema stippeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 55, 1018–1022.
- Jia, Y., Hoang, M. H., Jun, H., Lee, J. H., & Lee, S. (2013). Cyanidin, a natural flavonoid, is an agonistic ligand for liver X receptor alpha and beta and reduces cellular lipid accumulation in macrophages and hepatocytes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(14), 4185–4190.
- Jia, Y., Kim, J., Jun, H., Kim, S., Lee, J., Hien, M., Sook, H., Ihl, H., Hwang, K., Um, S., & Lee, S. (2013). Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reducing hepatic lipid. *Biochim Biophys Acta*, 1831(4), 698–708.
- Jin, Y., & Fu, J. (2019). Novel Insights Into the NLRP3 Inflammasome in Atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*, 8(12), 1–12.
- Juan, C. A., de la Lastra, J. M. P., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 1–21.
- Kalaycıoğlu, Z., & Erım, F. B. (2017). Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food Chemistry*, 221, 496–507.
- Kandyliş, P., & Kokkinomagoulos, E. (2020). Food applications and potential health benefits of pomegranate and its derivatives. *Foods*, 9(2), 1–22.
- Kang, H., Li, X., Xiong, K., Song, Z., Tian, J., Wen, Y., Sun, A., & Deng, X. (2021). The Entry and Egress of Monocytes in Atherosclerosis : A Biochemical and Biomechanical Driven Process. *Cardiovascular and Therapeutics*, 2021, 1–17.
- Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J., & Aviram, M. (2001). Pomegranate Juice Supplementation to Atherosclerotic Mice Reduces Macrophage Lipid Peroxidation, Cellular Cholesterol Accumulation and Development of Atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*, 131(8), 2082–2089.
- Karahalil, B., Hare, E., Koç, G., Uslu, İ., Şentürk, K., & Özkan, Y. (2017). Hepatotoxicity associated with

- statins. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 68(4), 254–260.
- Karapetsi, L., Pantelidis, G., Pratsinakis, E. D., & Drogoudi, P. (2021). Fruit Quality Traits and Genotypic Characterization in a Pomegranate Ex Situ (*Punica granatum L.*) Collection in Greece. *Agriculture*, 11, 1–21.
- Kasapis, C., & Gurm, H. S. (2010). Current Approach to the Diagnosis and Treatment of Femoral-Popliteal Arterial Disease. A Systematic Review. *Current Cardiology Reviews*, 5(4), 296–311.
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(11).
- Katzmarzyk, P. T., Ross, R., Blair, S. N., & Després, J. P. (2020). Should we target increased physical activity or less sedentary behavior in the battle against cardiovascular disease risk development? *Atherosclerosis*, 311(March), 107–115.
- Kesur, P., Gahlout, M., Chauhan, P. B., & Prajapati, H. V. (2016). Evaluation of Antimicrobial Properties of Peels and Juice Extract of *Punica Granatum* (Pomegranate). *International Journal of Research and Scientific Innovation*, 3, 11–20.
- Khadivi, A., & Arab, M. (2021). Identification of the superior genotypes of pomegranate (*Punica granatum L.*) using morphological and fruit characters. *Food Science and Nutrition*, 9(8), 4578–4588.
- Khadivi, A., Ayenehkar, D., Kazemi, M., & Khaleghi, A. (2018). Phenotypic and pomological characterization of a pomegranate (*Punica granatum L.*) germplasm collection and identification of the promising selections. *Scientia Horticulturae*, 238(February), 234–245.
- Khajebishak, Y., Payahoo, L., Alivand, M., Hamishehkar, H., Mobasser, M., Ebrahimzadeh, V., Alipour, M., & Alipour, B. (2019). Effect of pomegranate seed oil supplementation on the GLUT-4 gene expression and glycemic control in obese people with type 2 diabetes: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 19621–19628.
- Khajebishak, Y., Payahoo, L., Hamishehkar, H., Alivand, M., Alipour, M., Solhi, M., & Alipour, B. (2019). Effect of pomegranate seed oil on the expression of PPAR- γ and pro-inflammatory biomarkers in obese type 2 diabetic patients. *Nutrition and Food Science*, 49(5), 854–865.
- Khaleel, A. I., Sijam, K., Rashid, T. S., & Bin Ahmad, K. (2016). Phytochemical Determination and Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Extracts against Plant Pathogenic Bacteria. *American Journal of Plant Sciences*, 7(1), 159–166.
- Kim, B., Ku, C. S., Pham, T. X., Park, Y., Martin, D. A., Xie, L., Taheri, R., Lee, J., & Bolling, B. W. (2013). *Aronia melanocarpa* (chokeberry) polyphenol – rich extract improves antioxidant function and reduces total plasma cholesterol in apolipoprotein E knockout mice. *Nutrition Research*, 33(5), 406–413.
- Kim, K. W., Ivanov, S., & Williams, J. W. (2020). Monocyte Recruitment, Specification, and Function in Atherosclerosis. *Cells*, 10(1), 1–16.
- Kim, Y. E., Hwang, C. J., Lee, H. P., Kim, C. S., Son, D. J., Ham, Y. W., Hellström, M., Han, S. B., Kim, H. S., Park, E. K., & Hong, J. T. (2017). Inhibitory effect of punicalagin on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, oxidative stress and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB. *Neuropharmacology*, 117, 21–32.
- Kim, Y. H., & Choi, E. M. (2009). Stimulation of Osteoblastic Differentiation and Inhibition of Interleukin-6 and Nitric Oxide in MC3T3-E1 Cells by Pomegranate Ethanol Extract. *Phytotherapy Research*, 23, 737–739.
- Kiokias, S., Proestos, C., & Oreopoulou, V. (2018). Effect of natural food antioxidants against ldl and dna oxidative changes. *Antioxidants*, 7(10), 1–20.
- Kirichenko, T. V., Sukhorukov, V. N., Markin, A. M., Nikiforov, N. G., Liu, P. Y., Sobenin, I. A., Tarasov, V. V., Orekhov, A. N., & Aliev, G. (2020). Medicinal Plants as a Potential and Successful Treatment Option in the Context of Atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 403.
- Koch, W. (2019). Dietary polyphenols-important non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A systematic review. *Nutrients*, 11(5), 1–35.
- Kocyigit, D., Gurses, K. M., & Tokgozoglu, L. (2020). Anti-inflammatory therapy in atherosclerosis.

- Front Biosci*, 1(25), 242–269.
- Koffi, N., Beugré, K., Guédé N., Z., Dossahoua, T., & Laurent, A.-A. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6, 1–15.
- Kojadinovic, M. I., Arsic, A. C., Debeljak-Martacic, J. D., I., A., Konic-Ristic, Kardum, N. D., Popovic, T. B., & Glibetic, M. D. (2017). Consumption of pomegranate juice decreases blood lipid peroxidation and levels of arachidonic acid in women with metabolic syndrome. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1798–1804.
- Kollau, A., Gesslbauer, B., Russwurm, M., Koesling, D., Gorren, A. C. F., Schrammel, A., & Mayer, B. (2018). Modulation of nitric oxide-stimulated soluble guanylyl cyclase activity by cytoskeleton-associated proteins in vascular smooth muscle. *Biochemical Pharmacology*, 156, 168–176.
- Kontush, A. (2020). HDL and Reverse Remnant-Cholesterol Transport (RRT): Relevance to Cardiovascular Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 26(12), 1086–1100.
- Konukoglu, D., & Uzun, H. (2016). Endothelial dysfunction and hypertension. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 956, 511–540.
- Kostka, T., Ostberg-pottho, J. J., Briviba, K., Matsugo, S., Winterhalter, P., & Esatbeyoglu, T. (2020). Pomegranate (*Punica granatum* L.) Extract and Its Anthocyanin and Copigment Fractions—Free Radical Scavenging Activity and Influence on Cellular Oxidative Stress. *Foods*, 9, 1–17.
- Kowara, M., & Cudnoch-Jedrzejewska, A. (2021). Pathophysiology of atherosclerotic plaque development-contemporary experience and new directions in research. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3513.
- Kujawska, M., Jourdes, M., Kurpiak, M., Szulc, M., Szafer, H., Chmielarz, P., Kreiner, G., Krajka-Kuźniak, V., Mikołajczak, P. Ł., Teissedre, P. L., & Jodynys-Liebert, J. (2020). Neuroprotective effects of pomegranate juice against parkinson's disease and presence of ellagitannins-derived metabolite—uroolithin A—in the brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 202.
- Kulkarni, A. P., Mahal, H. S., Kapoor, S., & Aradhya, S. M. (2007). In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic action of punicalagin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1491–1500.
- Kumar, A., Giannopoulos, A. A., & Chatzizisis, Y. S. (2021). The stenotic vulnerable plaque: Identifying the substrate of acute coronary syndromes. *Atherosclerosis*, 320, 95–97.
- Kumar, R. S., Venkateshwar, C., Samuel, G., & Rao, S. G. (2013). Phytochemical Screening of some compounds from plant leaf extracts of *Holoptelea integrifolia* (Planch .) and *Celestrus emarginata* (Grah .) used by Gondu tribes at Adilabad District ,. *International Journal of Engineering Science Invention*, 2(8), 65–70.
- Kylli, P. (2011). *Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties*.
- Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301–311.
- Lampakis, D., Skenderidis, P., & Leontopoulos, S. (2021). Technologies and extraction methods of polyphenolic compounds derived from pomegranate (*Punica granatum*) peels. a mini review. *Processes*, 9(2), 1–14.
- Laurent, S., & Boutouyrie, P. (2020). Arterial Stiffness and Hypertension in the Elderly. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, 1–13.
- Lavoro, A., Falzone, L., Gattuso, G., Salemi, R., Cultrera, G., Leone, G., Scandurra, G., Candido, S., & Libra, M. (2021). Pomegranate: A promising avenue against the most common chronic diseases and their associated risk factors (Review). *International Journal of Functional Nutrition*, 2(2), 1–12.
- Lechner, K., von Schacky, C., McKenzie, A. L., Worm, N., Nixdorff, U., Lechner, B., Kränkel, N., Halle, M., Krauss, R. M., & Scherr, J. (2020). Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *European Journal of Preventive Cardiology*, 27(4), 394–406.
- Legua, P., Melgarejo, P., Haddioui, A., Martínez, J. ., Martínez, M., Hmid, I., Hanine, H., & Hernández,

- F. (2012). Characterization of six varieties of Moroccan pomegranate. *Options Méditerranéennes. Séries A: Mediterranean Seminars*, 103, 83–86.
- Lenfant, C., Cleeman, J. I., Ganiats, T. G., Graham, G., & R.E. Kleinman. (2001). Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Programme. *JAMA* 285, 285(19), 2486–2497.
- Lennox, R. R., Moffett, C., Porter, D. W., Irwin, N., Gault, V. A., & Flatt, P. R. (2015). Effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout and a high-fat diet on cognitive function and hippocampal gene expression in mice. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 1544–1548.
- Leri, M., Scuto, M., Ontario, M. L., Calabrese, V., Calabrese, E. J., Bucciantini, M., & Stefani, M. (2020). Healthy effects of plant polyphenols: Molecular mechanisms. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 4).
- Les, F., Arbonés-Mainar, J. M., Valero, M. S., & López, V. (2018). Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 220(March), 67–74.
- Les, F., Carpené, C., Arbonés-Mainar, J. M., Decaunes, P., Valero, M. S., & López, V. (2017). Pomegranate juice and its main polyphenols exhibit direct effects on amine oxidases from human adipose tissue and inhibit lipid metabolism in adipocytes. *Journal of Functional Foods*, 33, 323–331.
- Levy, D., Reichert, C. O., & Bydlowski, S. P. (2019). Paraoxonases activities and polymorphisms in elderly and old-age diseases: An overview. *Antioxidants*, 8(5), 1–24.
- Li, H. Y., Yang, M., Li, Z., & Meng, Z. (2017). Curcumin inhibits angiotensin II-induced inflammation and proliferation of rat vascular smooth muscle cells by elevating PPAR- γ activity and reducing oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(5), 1307–1316.
- Li, P., Xie, C., Zhong, J., Guo, Z., Guo, K., & Tu, Q. (2021). Melatonin Attenuates ox-LDL-Induced Endothelial Dysfunction by Reducing ER Stress and Inhibiting JNK/Mff Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–10.
- Li, Yali, Yang, F., Zheng, W., Hu, M., Wang, J., Ma, S., Deng, Y., Luo, Y., Ye, T., & Yin, W. (2016). Punica granatum (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 80, 227–235.
- Li, Yunfeng, Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254–260.
- Li, Z., Summanen, P. H., Komoriya, T., Henning, S. M., Lee, R. P., Carlson, E., Heber, D., & Finegold, S. M. (2015). Pomegranate ellagitannins stimulate growth of gut bacteria invitro: Implications for prebiotic and metabolic effects. *Anaerobe*, 34, 164–168.
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1–18.
- Lin, H. C., Hsieh, M. J., Peng, C. H., Yang, S. F., & Huang, C. N. (2015). Pterostilbene Inhibits Vascular Smooth Muscle Cells Migration and Matrix Metalloproteinase-2 through Modulation of MAPK Pathway. *Journal of Food Science*, 80(10), 2331–2335.
- Lin, P., Ji, H. H., Li, Y. J., & Guo, S. D. (2021). Macrophage Plasticity and Atherosclerosis Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(May), 1–21.
- Little, P. J., Askew, C. D., & Xu, S. (2021). Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease : History and Analysis of the Clinical Utility of the Relationship. *Biomedicines*, 9, 1–9.
- Little, T. J., Horowitz, M., & Feinle-Bisset, C. (2007). Modulation by high-fat diets of gastrointestinal function and hormones associated with the regulation of energy intake: Implications for the pathophysiology of obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86(3), 531–541.
- Liu, C., Guo, H., DaSilva, N. A., Li, D., Zhang, K., Wan, Y., Gao, X. H., Chen, H. D., Seeram, N. P., & Ma,

- H. (2019). Pomegranate (*Punica granatum*) phenolics ameliorate hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cytotoxicity in human keratinocytes. *Journal of Functional Foods*, 54(August 2018), 559–567.
- Liu, R., Li, J., Cheng, Y., Huo, T., Xue, J., Liu, Y., Liu, J., & Chen, X. (2015). Effects of ellagic acid-rich extract of pomegranates peel on regulation of cholesterol metabolism and its molecular mechanism in hamsters. *Food and Function*, 6(3), 780–787.
- Liu, X., Fan, Y., & Deng, X. (2011). Effect of the endothelial glycocalyx layer on arterial LDL transport under normal and high pressure. *Journal of Theoretical Biology*, 283(1), 71–81.
- Lobatto, M. E., Fayad, Z. A., Silvera, S., Vucic, E., Calcagno, C., Mani, V., Dickson, S. D., Nicolay, K., Banciu, M., Schiffelers, R. M., Metselaar, J. M., Van Bloois, L., Wu, H. S., Fallon, J. T., Rudd, J. H., Fuster, V., Fisher, E. A., Storm, G., & Mulder, W. J. M. (2010). Multimodal clinical imaging to longitudinally assess a nanomedical anti-inflammatory treatment in experimental atherosclerosis. *Molecular Pharmaceutics*, 7(6), 2020–2029.
- Loperena, R., & Harrison, D. G. (2017). Oxidative Stress and Hypertensive Diseases Roxana. In *Physiology & behavior* (Vol. 101, Issue 1).
- Lorenzatti, A. J., & Toth, P. P. (2020). New perspectives on atherogenic dyslipidaemia and cardiovascular disease. *European Cardiology Review*, 15.
- Loukhmas, S., Kerak, E., Elgadi, S., Ettalibi, F., El Antari, A., & Harrak, H. (2021). Oil Content, Fatty Acid Composition, Physicochemical Properties, and Antioxidant Activity of Seed Oils of Ten Moroccan Pomegranate Cultivars. *Journal of Food Quality*, 2021, 1–13.
- Loukhmas, S., Kerak, E., Outaki, M., Belaqziz, M., & Harrak, H. (2020). Assessment of minerals, bioactive compounds, and antioxidant activity of ten moroccan pomegranate cultivars. *Journal of Food Quality*, 2020, 1–10.
- Lum, H., & Roebuck, K. A. (2001). Oxidant stress and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, 719–741.
- Luo, Jie, Yang, H., & Song, B. L. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 225–245.
- Luo, Jing, Si, H., Jia, Z., & Liu, D. (2021). Dietary anti-aging polyphenols and potential mechanisms. *Antioxidants*, 10(2), 1–20.
- Luo, X., Lv, Y., Bai, X., Qi, J., Weng, X., Liu, S., Bao, X., Jia, H., & Yu, B. (2021). Plaque Erosion: A Distinctive Pathological Mechanism of Acute Coronary Syndrome. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8(September), 1–11.
- Ma, Y. Q., Chen, J. C., Liu, D. H., & Ye, X. Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1), 57–62.
- Magangana, T. P., Makunga, N. P., Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2020). Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*punica granatum* L.) peel waste: A review. *Molecules*, 25(20), 1–34.
- Magangana, T. P., Makunga, N. P., la Grange, C., Stander, M. A., Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2021). Blanching pre-treatment promotes high yields, bioactive compounds, antioxidants, enzyme inactivation and antibacterial activity of ‘wonderful’ pomegranate peel extracts at three different harvest maturities. *Antioxidants*, 10(7), 1–25.
- Mahmood, M. H., Osama, A. K., Makky, E. A., Rahim, M. H., Ali, N. H. M., & Hazrudin, N. D. (2019). Phytochemical Screening, antimicrobial and antioxidant efficacy of some plant extracts and their mixtures. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 346(1), 1–12.
- Mäkinen, P., Ruotsalainen, A., & Ylä-herttua, S. (2020). Nucleic Acid – Based Therapies for Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 22(2), 1–8.
- Makled, M. N., El-Awady, M. S., Abdelaziz, R. R., Atwan, N., Guns, E. T., Gameil, N. M., Shehab El-Din, A. B., & Ammar, E. M. (2016). Pomegranate protects liver against cecal ligation and puncture-induced oxidative stress and inflammation in rats through TLR4/NF-κB pathway inhibition. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 43, 182–192.
- Malak Eddebbagh, Mouhcine Massoudi, Abdelmjid Abourriche, Mohamed Berrada, Mohamed

- Attaleb, Laïla Benbacer, & Ahmed Bennamara. (2016). Correlation of the Cytotoxic and Antioxidant Activities of Moroccan Pomegranate (*Punica Granatum*) with Phenolic and Flavonoid Contents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(9), 511–519.
- Malekmohammad, K., Sewell, R. D. E., & Rafieian-Kopaei, M. (2019). Antioxidants and atherosclerosis: Mechanistic aspects. *Biomolecules*, 9(8), 1–19.
- Malik, R., Georgakis, M. K., Vujkovic, M., Damrauer, S. M., Elliott, P., Karhunen, V., Giontella, A., Fava, C., Hellwege, J. N., Shuey, M. M., Edwards, T. L., Rogne, T., Åsvold, B. O., Brumpton, B. M., Burgess, S., Dichgans, M., & Gill, D. (2021). Relationship between Blood Pressure and Incident Cardiovascular Disease: Linear and Nonlinear Mendelian Randomization Analyses. *Hypertension*, 77, 2004–2013.
- Mansour, E., Ben khaled, A., Haddad, M., Abid, M., Bachar, K., & Ferchichi, A. (2011). Selection of pomegranate (*Punica granatum L.*) in south-eastern Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(46), 9352–9361.
- Marchini, T., Mitre, L. S., & Wolf, D. (2021). Inflammatory Cell Recruitment in Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(February), 1–12.
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., & Ismail, N. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116(1), 306–312.
- Márquez, A. B., van der Vorst, E. P. C., & Maas, S. L. (2021). Key chemokine pathways in atherosclerosis and their therapeutic potential. *Journal of Clinical Medicine*, 10(17), 1–25.
- Marsoul, A., Ijjaali, M., Elhajjaji, F., Taleb, M., Salim, R., & Boukir, A. (2020). Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of pomegranate bark (*Punica granatum L.*): Evaluation of the inhibitory effect in acidic medium 1 M HCl. *Materials Today: Proceedings*, 27, 3193–3198.
- Martens, S., Preuß, A., & Matern, U. (2010). Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana L.* *Phytochemistry*, 71(10), 1040–1049.
- Martínez, J. J., Melgarejo, P., Hernández, F., Salazar, D. M., & Martínez, R. (2006). Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 241–246.
- Martínez, Juan José, Hernández, F., Abdelmajid, H., Legua, P., Martínez, R., Amine, A. El, & Melgarejo, P. (2012). Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: Processing and fresh market aptitudes. *Scientia Horticulturae*, 140, 100–106.
- Mas-Bargues, C., Escrivá, C., Dromant, M., Borrás, C., & Viña, J. (2021). Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 709, 1–7.
- Mattiello, T., Trifirò, E., Jotti, G. S., & Pulcinelli, F. M. (2009). Effects of pomegranate juice and extract polyphenols on platelet function. *Journal of Medicinal Food*, 12(2), 334–339.
- Mattila, P., Pihlava, J. M., & Hellström, J. (2005). Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8290–8295.
- Maurent, K. (2017). *Synthèse de composés phénoliques de type diarylheptanoïde. Evaluation de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires.*
- Medina-leyte, D. J., Zepeda-garc, O., & Dom, M. (2021). Endothelial Dysfunction , Inflammation and Coronary Artery Disease : Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3850.
- Mekni, M., Kharroubi, W., Cheraief, I., & Hammami, M. (2019). Pomological, Organoleptic and Biochemical Characterizations of Tunisian Pomegranate Fruits *Punica granatum L.* *American Journal of Plant Sciences*, 10(7), 1181–1195.
- Melgarejo-Sánchez, P., Martínez, J. J., Legua, P., Martínez, R., Hernández, F., & Melgarejo, P. (2015). Quality, antioxidant activity and total phenols of six Spanish pomegranates clones. *Scientia Horticulturae*, 182, 65–72.

- Melgarejo, P., Salazar, D. M., & Artés, F. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research and Technology*, 211(3), 185–190.
- Mena, P., Calani, L., Dall’Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A., & Del Rio, D. (2012). Rapid and comprehensive evaluation of (Poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17(12), 14821–14840.
- Mercadante, A. A., & Raja, A. (2020). Anatomy, Arteries. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Meziane, Z. K., Elothmani, D., & Benhadja, L. B. (2016). Morphological and physicochemical characteristics of three pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in northern Algeria. *Fruits*, 71(1), 17–26.
- Michel, T. (2011). *Nouvelles méthodologies d’extraction, de fractionnement et d’identification : application aux molécules bioactives de l’argousier (Hippophae rhamnoides) Thomas*. 286.
- Michicotl-Meneses, M. M., Thompson-Bonilla, M. D. R., Reyes-López, C. A., García-Pérez, B. E., López-Tenorio, I. I., Ordaz-Pichardo, C., & Jaramillo-Flores, M. E. (2021). Inflammation markers in adipose tissue and cardiovascular risk reduction by pomegranate juice in obesity induced by a hypercaloric diet in wistar rats. *Nutrients*, 13(8), 1–17.
- Middha, S. K., Usha, T., & Pande, V. (2013). HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 1–6.
- Millar, C. L., Duclos, Q., & Blesso, C. N. (2017). Effects of Dietary Flavonoids on Reverse Cholesterol Transport, HDL Metabolism, and HDL Function. *Adv Nutr*, 8(2), 226–239.
- Minelli, S., Minelli, P., & Montinari, M. R. (2020). Reflections on atherosclerosis: Lesson from the past and future research directions. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 13, 621–633.
- Mishchenko, E. L., Mishchenko, A. M., & Ivanisenko, V. A. (2021). Mechanosensitive molecular interactions in atherogenic regions of the arteries: Development of atherosclerosis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*, 25(5), 552–561.
- Moga, A., Dimienescu, O. G., Balan, A., Dima, L., Toma, S. I., Bîgiu, N. F., & Blidaru, A. (2021). Pharmacological and therapeutic properties of punica granatum phytochemicals: Possible roles in breast cancer marius. *Molecules*, 26(4), 1–20.
- Moneam, N. M. A., Sharaky, A. S., & Badreldin, M. M. (1988). Oestrogen content of pomegranate seeds. *Journal of Chromatography*, 438, 438–442.
- Mónica Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Current Protocols of Food Analytical Chemistry*, 1–13.
- Monsalve, B., Concha-meyer, A., Palomo, I., & Fuentes, E. (2017). Mechanisms of Endothelial Protection by Natural Bioactive Compounds from Fruit and Vegetables. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 89(1), 615–633.
- Moore, K. J., & Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3), 341–355.
- Moorthy, K., Punitha, T., Vinodhini, R., Sureshkumar, B. T., Vijayalakshmi, P., & Thajuddin, N. (2013). Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn. (PERICARP). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(9), 474–479.
- Morgan, M. J., Kim, Y. S., & Liu, Z. (2007). Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxidants and Redox Signaling*, 9(9), 1471–1483.
- Morittu, V. M., Mastellone, V., Tundis, R., Loizzo, M. R., Tudisco, R., Figoli, A., Cassano, A., Musco, N., Britti, D., Infascelli, F., & Lombardi, P. (2020). Antioxidant, Biochemical, and In-Life Effects of *Punica granatum* L. Natural Juice vs. Clarified Juice by Polyvinylidene Fluoride Membrane. *Foods*, 9, 242.
- Moroni, F., Ammirati, E., Norata, G. D., Magnoni, M., & Camici, P. G. (2019). The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neovascularization, and Atherothrombosis. *Mediators of Inflammation*, 2019, 1–11.
- Mowyna, M. N. Bin, Binobead, M., Badr, N. A. Al, AlSedairy, S., Elredh, I. A. R., & WedadSaeed Alqahtani. (2019). Effect of Saudi and Egyptian Pomegranate Polyphenols in Regulating the

- Activity of Pon1, Pon2 and Lipid Profile for Preventing Coronary Heart Disease. *Journal of Regenerative Biology and Medicine*, 1(1), 1–12.
- Mphahlele, R. R., Fawole, O. A., Mokwena, L. M., & Opara, U. L. (2016). Effect of extraction method on chemical, volatile composition and antioxidant properties of pomegranate juice. *South African Journal of Botany*, 103, 135–144.
- Mthembu, S. X. H., Dlodla, P. V., Ziqubu, K., Nyambuya, T. M., Kappo, A. P., Madoroba, E., Nyawo, T. A., Nkambule, B. B., Silvestri, S., Muller, C. J. F., & Mazibuko-Mbeje, S. E. (2021). The potential role of polyphenols in modulating mitochondrial bioenergetics within the skeletal muscle: A systematic review of preclinical models. *Molecules*, 26(9), 1–14.
- Mucha, P., Skoczyńska, A., Małecka, M., Hikisz, P., & Budzisz, E. (2021). Overview of the antioxidant and anti-inflammatory activities of selected plant compounds and their metal ions complexes. *Molecules*, 26(16).
- Munjal, A., & Bordoni, B. (2020). Histology, Vascular. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Muruganandan, S., Srinivasan, K., Gupta, S., Gupta, P. K., & Lal, J. (2005). Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 497–501.
- Mury, P. (2018). *Mécanismes et impact de l'activité physique et de la sédentarité sur les facteurs de risque biologiques de l'instabilité de plaque d'athérosclérose carotidienne*.
- Mushenkova, N. V., Bezsonov, E. E., Orekhova, V. A., Popkova, T. V., Starodubova, A. V, & Orekhov, A. N. (2021). Recognition of Oxidized Lipids by Macrophages and Its Role in Atherosclerosis Development. *Biomedicines*, 9(915), 1–17.
- Mythilypriya, R., Shanthi, P., & Sachdanandam, P. (2007). Oral acute and subacute toxicity studies with kalpaamruthaa, a modified indigenous preparation, on rats. *Journal of Health Science*, 53(4), 351–358.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523–1542.
- Nagano, T., & Ito, H. (2018). Diet containing a polyphenol concentrate from pomegranate juice attenuates contact hypersensitivity in mice. *Journal of Functional Foods*, 45(December 2017), 247–253.
- Nakano, T., Inoue, I., & Murakoshi, T. (2019). A newly integrated model for intestinal cholesterol absorption and efflux reappraises how plant sterol intake reduces circulating cholesterol levels. *Nutrients*, 11(2), 1–18.
- Nakaya, K., Ayaori, M., & Ikewaki, K. (2017). Role of ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1 in Reverse Cholesterol Transport and Atherosclerosis. In *The HDL Handbook: Biological Functions and Clinical Implications: Third Edition* (pp. 121–151). Elsevier Inc.
- Nawwar, M. A. M., Hussein, S. A. M., & Merfort, I. (1994). Leaf phenolics of Punica granatum. *Phytochemistry*, 37(4), 1175–1177.
- Ndzie Noah, M. L., Adzika, G. K., Mprah, R., Adekunle, A. O., Adu-Amankwaah, J., & Sun, H. (2021). Sex–Gender Disparities in Cardiovascular Diseases: The Effects of Estrogen on eNOS, Lipid Profile, and NFATs During Catecholamine Stress. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8(February), 1–10.
- Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80(3), 393–397.
- Neyrinck, A. M., Van Hée, V. F., Bindels, L. B., De Backer, F., Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2013). Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: Potential implication of the gut microbiota. *British Journal of Nutrition*, 109(5), 802–809.
- Ng, C. J., Shih, D. M., Hama, S. Y., Villa, N., Navab, M., & Reddy, S. T. (2005). Serial Review : Paraoxonases The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 153–163.
- Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A.

- A. H., Cicogna, A. C., & Novelli Filho, J. L. V. B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41(1), 111–119.
- Nuncio-Jáuregui, N., Munera-Picazo, S., Calín-Sánchez, Á., Wojdyto, A., Hernández, F., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2015). Bioactive compound composition of pomegranate fruits removed during thinning. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 11–19.
- OECD/OCDE. (2001). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. *Organization for Economic Cooperation and Development Guideline for Testing of Chemicals. OECD. Test Guideline 423: Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method.*, 1–14.
- Oh, P.-S., Lee, S.-J., & Lim, K.-T. (2006). Hypolipidemic and Antioxidative Effects of the Plant Glycoprotein (36 kDa) from *Rhus verniciflua* Stokes Fruit in Triton WR-1339-Induced Hyperlipidemic Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(2), 447–456.
- Ohiagu, F. O., Chikezie, P. C., & Chikezie, C. M. (2021). Pathophysiology of diabetes mellitus complications: Metabolic events and control. *Biomedical Research and Therapy*, 8(3), 4243–4257.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
- Olea, E., Agapito, M. T., Gallego-Martin, T., Rocher, A., Gomez-Niño, A., Obeso, A., Gonzalez, C., & Yubero, S. (2014). Intermittent hypoxia and diet-induced obesity: Effects on oxidative status, sympathetic tone, plasma glucose and insulin levels, and arterial pressure. *Journal of Applied Physiology*, 117(7), 706–719.
- Omer, H. A. A., Abdel-Magid, S. S., & Awadalla, I. M. (2019). Nutritional and chemical evaluation of dried pomegranate (*Punica granatum* L.) peels and studying the impact of level of inclusion in ration formulation on productive performance of growing Ossimi lambs. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1).
- Ono, N. N., Bandaranayake, P. C. G., & Tian, L. (2012). Establishment of pomegranate (*Punica granatum*) hairy root cultures for genetic interrogation of the hydrolyzable tannin biosynthetic pathway. *Planta*, 236, 931–941.
- Orak, H. H., Yagar, H., & Isbilir, S. S. (2012). Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 373–387.
- Ouachrif, A., Khalki, H., Chaib, S., Mountassir, M., Aboufatima, R., Farouk, L., Benharraf, A., & Chait, A. (2012). Comparative study of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of two varieties of *Punica granatum*. *Pharmaceutical Biology*, 50(4), 429–438.
- Ouimet, M., Barrett, T. J., & Fisher, E. A. (2019). HDL and Reverse Cholesterol Transport: Basic Mechanisms and Their Roles in Vascular Health and Disease. *Circulation Research*, 124(10), 1505–1518.
- Oyedemi, S. O., Bradley, G., & Afolayan, A. J. (2010). In -vitro and -vivo antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(2), 070–078.
- Pagliarulo, C., De Vito, V., Picariello, G., Colicchio, R., Pastore, G., Salvatore, P., & Volpe, M. G. (2016). Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 190, 824–831.
- Pahwa, R., & Jialal, I. (2021). *Atherosclerosis*. StatPearls.
- Palacio Rojas, M., Prieto, C., Bermúdez, V., Garicano, C., Núñez Nava, T., Martínez, M. S., Salazar, J., Rojas, E., Pérez, A., Marca Vicuña, P., González Martínez, N., Maldonado Parra, S., Hoedebecke, K., D'Addosio, R., Cano, C., & Rojas, J. (2017). Dyslipidemia: Genetics, lipoprotein lipase and HindIII polymorphism. *F1000Research*, 6, 2073.
- Parcheta, M., Świsłocka, R., Orzechowska, S., Akimowicz, M., Choińska, R., & Lewandowski, W. (2021). Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials*, 14(8), 1–24.

- Park, S. Y., Bok, S. H., Jeon, S. M., Park, Y. B., Lee, S. J., Jeong, T. S., & Choi, M. S. (2002). Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutrition Research*, 22(3), 283–295.
- Park, Sin-hye, Kim, J., Lee, E., Han, S., Gong, J., & Kang, M. (2011). Dietary Ellagic Acid Attenuates Oxidized LDL Uptake and Stimulates Cholesterol Efflux in Murine Macrophages. *The Journal of Nutrition*, 141(11), 1932–1937.
- Park, Soojin, Seok, J. K., Kwak, J. Y., Suh, H., Kim, Y. M., & Boo, Y. C. (2016). Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extract in THP-1 Cells Exposed to Particulate Matter PM10. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–11.
- Parmar, H. S., & Kar, A. (2007). Antidiabetic potential of Citrus sinensis and Punica granatum peel extracts in alloxan treated male mice. *BioFactors*, 31(1), 17–24.
- Parmar, H. S., & Kar, A. (2008). Medicinal values of fruit peels from Citrus sinensis, Punica granatum, and Musa paradisiaca with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *Journal of Medicinal Food*, 11(2), 376–381.
- Pasha, K. V., Ratnavathi, C. V., Ajani, J., Raju, D., Kumar, S. M., & Beedu, S. R. (2018). Proximate, mineral composition and antioxidant activity of traditional small millets cultivated and consumed in Rayalaseema region of South India. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 652–660.
- Passafiume, R., Perrone, A., Sortino, G., Gianguzzi, G., Saletta, F., Gentile, C., & Farina, V. (2019). Chemical–physical characteristics, polyphenolic content and total antioxidant activity of three Italian-grown pomegranate cultivars. *NFS Journal*, 16, 9–14.
- Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants*, 8, 1–31.
- Patel, C., Dadhaniya, P., Hingorani, L., & Soni, M. G. (2008). Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2728–2735.
- Pearson, D. A., Paglieroni, T. G., Rein, D., Wun, T., Schramm, D. D., Wang, J. F., Holt, R. R., Gosselin, R., Schmitz, H. H., & Keen, C. L. (2002). The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thrombosis Research*, 106(4–5), 191–197.
- Peng, Y., Wang, G., Cao, F., & Fu, F. F. (2020). Collection and evaluation of thirty-seven pomegranate germplasm resources. *Applied Biological Chemistry*, 63(15), 1–15.
- Perez-Lasierra, J. L., Laclaustra, M., Guallar-Castillón, P., Casasnovas, J. A., Casajús, J. A., Jarauta, E., Gonzalez-Agüero, A., & Moreno-Franco, B. (2021). Daily Sitting for Long Periods Increases the Odds for Subclinical Atheroma Plaques. *Journal of Clinical Medicine*, 10(6), 1229.
- Peršurić, Ž., Martinović, L. S., Malenica, M., Gobin, I., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V., & Pavelić, S. K. (2020). Assessment of the Biological Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. *Molecules*, 25(24), 1–13.
- Peters, L. J. F., Jans, A., Bartneck, M., & van der Vorst, E. P. C. (2021). Immunomodulatory nanomedicine for the treatment of atherosclerosis. *Journal of Clinical Medicine*, 10(14), 1–15.
- Piepoli, M. F., Hoes, A. W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A. L., Cooney, M. T., Corrà, U., Cosyns, B., Deaton, C., Graham, I., Hall, M. S., Hobbs, F. D. R., Løchen, M. L., Löllgen, H., Marques-Vidal, P., Perk, J., Prescott, E., Redon, J., ... Gale, C. (2016). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal*, 37(29), 2315–2381.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
- Pignatelli, P., Menichelli, D., Pastori, D., & Violi, F. (2018). Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. *Kardiologia Polska*, 76(4), 713–722.
- Pirahanchi, Y., & Dimri, M. (2020). Biochemistry, Guanylate Cyclase. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Pirincioğlu, M., Kizil, G., Kizil, M., Kanay, Z., & Ketani, A. (2014). The protective role of pomegranate juice against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Toxicology and Industrial*

- Health*, 30(10), 910–918.
- Pontonio, E., Montemurro, M., Pinto, D., Marzani, B., Trani, A., Ferrara, G., Mazzeo, A., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2019). Lactic acid fermentation of pomegranate juice as a tool to improve antioxidant activity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–16.
- Poredos, P., & Jezovnik, M. K. (2021). Preclinical carotid atherosclerosis as an indicator of polyvascular disease: a narrative review. *Annals of Translational Medicine*, 9(14), 1204–1204.
- Poredos, P., Visnovic Poredos, A., & Gregoric, I. (2021). Endothelial Dysfunction and Its Clinical Implications. *Angiology*.
- Powell-Wiley, T. M., Poirier, P., Burke, L. E., Després, J.-P., Gordon-Larsen, P., Lavie, C. J., Lear, S. A., Ndumele, C. E., Neeland, I. J., Sanders, P., & St-Onge, M.-P. (2021). Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 143(21).
- Poznyak, A., Grechko, A. V., Poggio, P., Myasoedova, V. A., Alfieri, V., & Orekhov, A. N. (2020). The diabetes mellitus–atherosclerosis connection: The role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1–13.
- Poznyak, A. V., Grechko, A. V., Orekhova, V. A., Chegodaev, Y. S., Wu, W.-K., & Orekhov, A. N. (2020). Oxidative Stress and Antioxidants in Atherosclerosis Development and Treatment Anastasia. *Biology*, 9(3), 60.
- Poznyak, A. V., Nikiforov, N. G., Markin, A. M., Kashirskikh, D. A., Myasoedova, V. A., Gerasimova, E. V., & Orekhov, A. N. (2021). Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1–11.
- Price, M. L., Scoyoc, S. Van, & Butler, L. G. (1978). A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1214–1218.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402.
- Qian, Z., Zhao, Y., Wan, C., Deng, Y., Zhuang, Y., Xu, Y., Zhu, Y., Lu, S., & Bao, Z. (2021). Pyroptosis in the Initiation and Progression of Atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 1–11.
- Qiu, C., Zhao, X., Zhou, Q., & Zhang, Z. (2017). High-density lipoprotein cholesterol efflux capacity is inversely associated with cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Lipids in Health and Disease*, 16(212), 1–11.
- Qnais, E. Y., Elokda, A. S., Ghalyun, Y. Y. A., & Abdulla, F. A. (2007). Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of Punica granatum. (Pomegranate) Peels. *Pharmaceutical Biology*, 45(9), 715–720.
- Qu, W., Breksa, A. P., Pan, Z., & Ma, H. (2012). Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*, 132(3), 1585–1591.
- Radunić, M., Jukić Špika, M., Goreta Ban, S., Gadže, J., Díaz-Pérez, J. C., & Maclean, D. (2015). Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. *Food Chemistry*, 177, 53–60.
- Rahmat, A., Kumar, V., Fong, L. M., Endrini, S., & Sani, H. A. (2004). Determination of total antioxidant activity in three types of local vegetables shoots and the cytotoxic effect of their ethanolic extracts against different cancer cell lines. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(3), 308–311.
- Rajesh, K. D., Vasantha, S., Rajesh, N. V., & Panneerselvam, A. (2014). Qualitative and quantitative phytochemical analysis in four pteridophytes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 27(2), 408–412.
- Razani, Z., Dastani, M., & Kazerani, H. R. (2017). Cardioprotective Effects of Pomegranate (Punica granatum) Juice in Patients with Ischemic Heart Disease. *Phytotherapy Research*, 31(11), 1731–

- 1738.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Redha, A. A., Hasan, A. M., & Mandeel, Q. (2018). Phytochemical Determinations of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind and Aril Extracts and their Antioxidant, Antidiabetic and Antibacterial Activity. *Natural Products Chemistry and Research*, 6(4), 1–9.
- Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., & Keen, C. L. (2000). Cocoa inhibits platelet activation and function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(1), 30–35.
- Reis, A., Rocha, S., & de Freitas, V. (2021). Going “Green” in the Prevention and Management of Atherothrombotic Diseases: The Role of Dietary Polyphenols. *Journal of Clinical Medicine*, 10(7), 1–23.
- Restani, P. (2020). Polyphenol-rich foods for human health. *Nutrients*, 12(12), 1–2.
- Ricci, D., Giamperi, L., Bucchini, A., & Fraternali, D. (2006). Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia*, 77, 310–312.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956.
- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y., & Carvajal, K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutrition and Diabetes*, 10(24), 1–15.
- Rodriguez, J., Gilson, H., Jamart, C., Naslain, D., Pierre, N., Deldicque, L., & Francaux, M. (2015). Pomegranate and green tea extracts protect against ER stress induced by a high-fat diet in skeletal muscle of mice. *European Journal of Nutrition*, 54(3), 377–389.
- Rom, O., Korach-Rechtman, H., Hayek, T., Danin-Poleg, Y., Bar, H., Kashi, Y., & Aviram, M. (2017). Acrolein increases macrophage atherogenicity in association with gut microbiota remodeling in atherosclerotic mice: protective role for the polyphenol-rich pomegranate juice. *Archives of Toxicology*, 91(4), 1709–1725.
- Roopalatha, U. C., & Mala Nair, V. (2013). Phytochemical analysis of successive reextracts of the leaves of *Moringa oleifera* Lam. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 629–634.
- Rosenblat, M., Volkova, N., & Aviram, M. (2010). Pomegranate juice (PJ) consumption antioxidative properties on mouse macrophages , but not PJ beneficial effects on macrophage cholesterol and triglyceride metabolism , are mediated via PJ-induced stimulation of macrophage PON2. *Atherosclerosis*, 212(1), 86–92.
- Rosenblat, M., Volkova, N., & Aviram, M. (2013). Pomegranate phytosterol (b-sitosterol) and polyphenolic antioxidant (punicalagin) addition to statin, significantly protected against macrophage foam cells formation. *Atherosclerosis*, 226(1), 110–117.
- Rosenkranz, S., Knirel, D., Dietrich, H., Flesch, M., Erdmann, E., & Böhm, M. (2002). Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the “French paradox”. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(14), 1958–1960.
- Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Davidson, W. S., Fayad, Z. A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X. C., Phillips, M. C., Rader, D. J., Remaley, A. T., Rothblat, G. H., Tall, A. R., & Yvan-Charvet, L. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: Advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, 125(15), 1905–1919.
- Ross, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annual Review of Physiology*, 57, 791–804.
- Roumeliotis, S., Mallamaci, F., & Zoccali, C. (2020). Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease , from Biology to Clinical Outcomes : A 2020 Update. *J Clin Med*, 9(8), 2359.
- Roux-mallouf, T. Le. (2020). *Effet des précurseurs de monoxyde d’azote sur la fonction vasculaire et la performance à l’exercice.*

- Rowayshed, G., Salama, A., & Abul-Fadl, M., Akila-Hamza, S. and Emad, A. M. (2013). Nutritional and Chemical Evaluation for Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peel and Seeds Powders By Products. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 3(4), 169–179.
- Ruch, R. J., Cheng, S. jun, & Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003–1008.
- Rull, G., Mohd-Zain, Z. N., Shiel, J., Lundberg, M. H., Collier, D. J., Johnston, A., Warner, T. D., & Corder, R. (2015). Effects of high flavanol dark chocolate on cardiovascular function and platelet aggregation. *Vascular Pharmacology*, 71, 70–78.
- Rummun, N., Somanah, J., Ramsaha, S., Bahorun, T., & Neergheen-Bhujun, V. S. (2013). Bioactivity of Nonedible Parts of *Punica granatum* L. *International Journal of Food Science*, 2013, 12.
- Russo, M., Fanali, C., Tripodo, G., Dugo, P., Muleo, R., Dugo, L., De Gara, L., & Mondello, L. (2018). Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: application to different Italian varieties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3507–3520.
- Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., & Ayed, N. (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products*, 40(1), 239–246.
- Saad, P. G., Castelino, R. D., Ravi, V., Al-Amri, I. S., & Khan, S. A. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using Omani pomegranate peel extract and two polyphenolic natural products: characterization and comparison of their antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1), 1–10.
- Sabraoui, T., Khider, T., Nasser, B., Eddoha, R., Moujahid, A., Benbachir, M., & Essamadi, A. (2020). Determination of Punicalagins Content, Metal Chelating, and Antioxidant Properties of Edible Pomegranate (*Punica granatum* L) Peels and Seeds Grown in Morocco. *International Journal of Food Science*, 2020, 1–8.
- Sadeghipour, A., Eidi, M., Ilchizadeh Kavgani, A., Ghahramani, R., Shahabzadeh, S., & Anissian, A. (2014). Lipid lowering effect of punica granatum L. Peel in high lipid diet fed male rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–5.
- Saha, A., & Garg, A. (2021). Severe Liver Injury Associated With High-Dose Atorvastatin Therapy. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 9, 1–4.
- Saha, K., Lajis, N. H., Israf, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S., & Syahida, A. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2), 263–267.
- Sajjad, W., Sohail, M., Ali, B., Haq, A., Hayat, M., Khan, I., Ahmad, M., & Khan, S. (2015). Antibacterial activity of *Punica granatum* peel extract. *Mycopath*, 13(2), 105–111.
- Saleh, M., Amro, L., Barakat, H., Baker, R., Reyash, A. A., Amro, R., & Qasem, J. (2021). Fruit By-Product Processing and Bioactive Compounds. *Journal of Food Quality*, 2021, 1–9.
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide research trends on medicinal plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10), 3376.
- Sanchez, C. (2017). *Athérosclérose : pathologies associées , prévention et traitements*.
- Sanchis-Gomar, F., Perez-Quilis, C., Leischik, R., & Lucia, A. (2016). Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Annals of Translational Medicine*, 4(13), 1–12.
- Santamarina-Fojo, S., González-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E., & Nong, Z. (2004). Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(10), 1750–1754.
- Sarkar, S., Siddiqui, A. A., Mazumder, S., De, R., Saha, S. J., Banerjee, C., Iqbal, M. S., Adhikari, S., Alam, A., Roy, S., & Bandyopadhyay, U. (2015). Ellagic Acid, a Dietary Polyphenol, Inhibits Tautomerase Activity of Human Macrophage Migration Inhibitory Factor and Its Pro-inflammatory Responses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(20), 4988–4998.

- Sasc, R., Clement, A., Radu, R., Prisacariu, C., & St, C. (2021). Triglyceride-Rich Lipoproteins and Their Remnants as Silent Promoters of Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Other Metabolic Disorders : A Review. *Nutrients*, 13(6), 1774.
- Saso, L., Güreer-Orhan, H., & Stepanić, V. (2020). Modulators of oxidative stress: Chemical and pharmacological aspects. *Antioxidants*, 9(8), 1–6.
- Satheesh Kumar Bhandary, B., Sharmila, K. P., Suchetha Kumari, N., & Vadisha Bhat, S. (2013). Acute and subacute toxicity study of the ethanol extracts of *Punica granatum* (Linn). whole fruit and seeds and synthetic ellagic acid in swiss albino mice. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(4), 192–198.
- Sattler, W., Mohr, D., & Stocker, R. (1994). Rapid Isolation of Lipoproteins and Assessment of Their Peroxidation by High-Performance Liquid Chromatography Postcolumn Chemiluminescence. *Methods in Enzymology*, 233, 469–489.
- Schäfer, S., & Zerneck, A. (2020). CD8+ T Cells in Atherosclerosis. *Cells*, 10(1), 37.
- Schwartz, C. J., & Mitchell, J. R. (1962). The morphology, terminology, and pathogenesis of arterial plaques. *Postgraduate Medical Journal*, 38, 25–34.
- Scoditti, E., Nestola, A., Massaro, M., Calabriso, N., Storelli, C., De Caterina, R., & Carluccio, M. A. (2014). Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKC α and PKC β 1 inhibition. *Atherosclerosis*, 232(1), 17–24.
- Seeram, N., Lee, R., Hardy, M., & Heber, D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk , a by-product of the commercial juice industry. *Separation Purification Technology*, 41, 49–55.
- Sellam, E. B., & Bour, A. (2016). Prévalence des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires chez la femme à Oujda (Maroc). *Medecine Des Maladies Metaboliques*, 10(1), 63–69.
- Shahamirian, M., Eskandari, M. H., Niakousari, M., Esteghlal, S., Hashemi Gahrue, H., & Mousavi Khaneghah, A. (2019). Incorporation of pomegranate rind powder extract and pomegranate juice into frozen burgers: oxidative stability, sensorial and microbiological characteristics. *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1174–1183.
- Shahoud, J. S., Miao, J. H., & Bolla, S. R. (2020). Anatomy, Thorax, Heart Aorta. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Sharma, K., & Es, C. (2018). Comparative studies of proximate , mineral and phytochemical compositions of pomegranate (*Punica granatum*) in peel , seed and whole fruit powder. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 3(2), 192–196.
- Shimada, K. (2009). Immune system and atherosclerotic disease - Heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Journal*, 73(6), 994–1001.
- Shirley, B. W. (1996). Flavonoid biosynthesis: “New” functions for an “old” pathway. *Trends in Plant Science*, 1(11), 377–382.
- Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K. A., & Haqqi, T. M. (2008). Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1 β -induced PGE 2 production in human chondrocytes in vitro. *Journal of Inflammation*, 5, 1–10.
- Siddarth, P., Li, Z., Miller, K. J., Ercoli, L. M., Merrill, D. A., Henning, S. M., Heber, D., & Small, G. W. (2019). Randomized placebo-controlled study of the memory effects of pomegranate juice in middle-aged and older adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1–8.
- Sikarwar, M. S., & Patil, M. B. (2012). Antihyperlipidemic activity of *Salacia chinensis* root extracts in triton-induced and atherogenic diet-induced hyperlipidemic rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(1), 88–92.
- Singh, B. M., Lamichhane, H. K., Srivatsa, S. S., Adhikari, P., Kshetri, B. J., Khatiwada, S., & Shrestha, D. B. (2020). Role of statins in the primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease and mortality in the population with mean cholesterol in the near-optimal to borderline high range: A systematic review and meta-analysis. *MedRxiv*, 2020.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2018). Phenolic compounds as beneficial phytochemicals

- in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chemistry*, 261, 75–86.
- Singh, M., Jha, A., Kumar, A., Hettiarachchy, N., Rai, A. K., & Sharma, D. (2014). Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (Punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2070–2077.
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. (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), 81–86.
- Singla, B., Lin, H. P., Ahn, W., White, J., & Csányi, G. (2021). Oxidatively modified ldl suppresses lymphangiogenesis via cd36 signaling. *Antioxidants*, 10(2), 1–21.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Sissoko, A. (2020). *Intérêt des marqueurs de l'inflammation dans l'athérosclérose périphérique des membres inférieurs au laboratoire de l'hôpital du Mali*.
- Sizar, O., Khare, S., Jamil, R. T., & Talati, R. (2021). Statin Medications. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Soehnlein, O., & Libby, P. (2021). Targeting inflammation in atherosclerosis — from experimental insights to the clinic. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(8), 589–610.
- Sohrab, G., Roshan, H., Ebrahimof, S., Nikpayam, O., Sotoudeh, G., & Siasi, F. (2019). Effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A single-blind randomized clinical trial. *Clinical Nutrition ESPEN*, 29, 30–35.
- Song, B., Li, J., & Li, J. (2016). Pomegranate peel extract polyphenols induced apoptosis in human hepatoma cells by mitochondrial pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 158–166.
- Song, L., Zhang, J., Lai, R., Li, Q., Ju, J., & Xu, H. (2021). Chinese Herbal Medicines and Active Metabolites: Potential Antioxidant Treatments for Atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 1–20.
- Song, X., Yan, G., Wang, H., & Lou, D. (2021). Septin 4 activates PPAR γ /LXR α signaling by upregulating ABCA1 and ABCG1 expression to inhibit the formation of THP1 macrophage derived foam cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22, 1–7.
- Souihol, C. E., Harmsen, M. C., Evans, P. C., & Krenning, G. (2018). Endothelial-Mesenchymal Transition in Atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 114(4), 565–577.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., & Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the council on arteriosclerosis, American heart association. *Circulation*, 92(5), 1355–1374.
- Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: An update. *Journal of Lipid Research*, 50.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., E. carew, T., C. khoo, J., & L. witztum, J. (1989). Modifications of low-density lipoprotein. *The New England Journal of Medicine*, 320(14), 915–924.
- Steinberg, D., & Witztum, J. L. (2010). History of discovery: Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12), 2311–2316.
- Stokes, K. Y., Cooper, D., Tailor, A., & Granger, D. N. (2002). Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: Role of nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(8), 1026–1036.
- Storlien, L. H., Huang, X. F., Lin, S., Xin, X., Wang, H. Q., & Else, P. L. (2001). Dietary fat subtypes and obesity. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 88, 148–154.
- Storniolo, C. E., Roselló-Catafau, J., Pintó, X., Mitjavila, M. T., & Moreno, J. J. (2014). Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biology*, 2(1),

- 971–977.
- Su, Lian-jiu, Zhang, J., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis , Autophagy , and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–13.
- Su, Lilly, Mittal, R., Ramgobin, D., Jain, R., & Jain, R. (2021). Current Management Guidelines on Hyperlipidemia: The Silent Killer. *Journal of Lipids*, 2021, 1–5.
- Suanarunsawat, T., Na Ayuthaya, W. D., Songsak, T., & Rattanamahaphoom, J. (2009). Anti-lipidemic actions of essential oil extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with high cholesterol diet. *Journal of Applied Biomedicine*, 7(1), 45–53.
- Subash, S., Braidly, N., Essa, M. M., Zayana, A. B., Ragini, V., Al-Adawi, S., Al-Asmi, A., & Guillemin, G. J. (2015). Long-term (15mo) dietary supplementation with pomegranates from Oman attenuates cognitive and behavioral deficits in a transgenic mice model of Alzheimer’s disease. *Nutrition*, 31(1), 223–229.
- Subash, S., Essa, M., Al-Asmi, A., Al-Adawi, S., Vaishnav, R., Braidly, N., Manivasagam, T., & Guillemin, G. (2014). Pomegranate from oman alleviates the brain oxidative damage in transgenic mouse model of alzheimer’s disease. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(4), 232–238.
- Suganya, N., Bhakkiyalakshmi, E., Sarada, D. V. L., & Ramkumar, K. M. (2016). Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: Role of polyphenols. *British Journal of Nutrition*, 116(2), 223–246.
- Sultana, B. B., Anwar, F., Asi, M. R., Ali, S., & Chatha, S. (2008). Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas y Aceites*, 59(3), 205–217.
- Summerhill, V. I., Grechko, A. V., Yet, S. F., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2019). The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3561.
- Sun, Y. qing, Tao, X., Men, X. ming, Xu, Z. wei, & Wang, T. (2017). In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8), 1808–1818.
- Suwaidi, J. Al, Hamasaki, S., Higano, S. T., Nishimura, R. A., & Holmes, D. R. (2000). Long-Term Follow-Up of Patients With Mild Coronary Artery Disease and Endothelial Dysfunction. *Circulation*, 101(9), 948–954.
- Suzuki-Sugihara, N., Kishimoto, Y., Saita, E., Taguchi, C., Kobayashi, M., Ichitani, M., Ukawa, Y., Sagesaka, Y. M., Suzuki, E., & Kondo, K. (2016). Green tea catechins prevent low-density lipoprotein oxidation via their accumulation in low-density lipoprotein particles in humans. *Nutrition Research*, 36(1), 16–23.
- Syed, D. N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2007). Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology*, 17(5), 377–385.
- Tabas, I., & Lichtman, A. H. (2017). Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity*, 47(4), 621–634.
- Tanaka, N., & Kashiwada, Y. (2021). Phytochemical studies on traditional herbal medicines based on the ethnopharmacological information obtained by field studies. *Journal of Natural Medicines*, 75(4), 762–783.
- Tapia-Campos, E., Ramírez-Anaya, J. D. P., Cavazos-Garduño, A., Serrano-Niño, J. C., Fragoso-Jiménez, J. C., & Castañeda-Saucedo, M. C. (2021). Morphological characterization of southern jalisco, mexico, pomegranate genotypes using aflp markers. *Agronomy*, 11(8), 1–15.
- Taylor, A. M., & Bordoni, B. (2020). Histology, Blood Vascular System. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Taylor, L. E., Gillis, E. E., Musall, J. B., Baban, B., & Sullivan, J. C. (2018). High-fat diet-induced hypertension is associated with a proinflammatory T cell profile in male and female dahl salt-sensitive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 315(6), 1713–1723.

- Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Vazifeshenas, M. R. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, *126*(2), 180–185.
- Tinebra, I., Scuderi, D., Sortino, G., Mazzaglia, A., & Farina, V. (2021). Pomegranate cultivation in mediterranean climate: Plant adaptation and fruit quality of ‘Mollar de Elche’ and ‘wonderful’ cultivars. *Agronomy*, *11*(1), 1–16.
- Tomas-Barberan, F. A., & Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 1024–1032.
- Tomaszewski, M., Stępień, K. M., Tomaszewska, J., & Czuczwar, S. J. (2011). Statin-induced myopathies. *Pharmacological Reports*, *63*(4), 859–866.
- Topalovi, A., & Mikulic-petkovsek, M. (2021). Journal of Food Composition and Analysis Phytochemical screening of wild pomegranate (*Punica granatum* L .) juices from the market. *Journal of Food Composition and Analysis*, *100*, 1–12.
- Touiss, I., Khatib, S., Bekkouch, O., Amrani, S., & Harnafi, H. (2017). Phenolic extract from *Ocimum basilicum* restores lipid metabolism in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice and prevents lipoprotein-rich plasma oxidation. *Food Science and Human Wellness*, *6*(1), 28–33.
- Tournadre, A. (2019). Statines, myalgies et rhabdomyolyse. *Revue Du Rhumatisme (Edition Française)*, *86*(4), 344–349.
- Trajkovska, K. T., & Topuzovska, S. (2017). High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: Strategies for raising HDL cholesterol. *Anatolian Journal of Cardiology*, *18*(2), 149–154.
- Tran, C. T., Wu, C. Y., Bordes, S., & Lui, F. (2020). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Abdominal Aorta. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Tresserra-rimbau, A., Rimm, E. B., Medina-remón, A., Martínez-gonzález, M. A., López-sabater, M. C., Covas, M. I., Corella, D., Salas-salvadó, J., Gómez-gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-majem, L., & Pintó, X. (2014). Polyphenol intake and mortality risk : a re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Medicine*, *12*(77), 1–11.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246.
- Turrini, E., Ferruzzi, L., & Fimognari, C. (2015). Potential effects of pomegranate polyphenols in cancer prevention and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*, 1–19.
- Ullah, F., Nasar Shah, S., Celik, A., Sohail, A., Iqbal, M., Saqib, S., Ali, A., & Gul, S. (2018). Traditional knowledge of medicinal herbs among indigenous communities in Maidan Valley, Lower Dir, Pakistan. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, *7*(6), 1–23.
- Uribe, K. B., Benito-Vicente, A., Martin, C., Blanco-Vaca, F., & Rotllan, N. (2021). (r)HDL in theranostics: How do we apply HDL’s biology for precision medicine in atherosclerosis management? *Biomaterials Science*, *9*(9), 3185–3208.
- Valero, C., & Ruiz-altisent, M. (2000). Design Guidelines for a Quality Assessment System of Fresh Fruits in Fruit Centers and Hypermarkets. *Agricultural Engineering International: CIGR Ejournal*, 1–21.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *39*(1), 44–84.
- van der Valk, F. M., Schulte, D. M., Meiler, S., Tang, J., Zheng, K. H., Van den Bossche, J., Seijkens, T., Laudes, M., de Winther, M., Lutgens, E., Alaarg, A., Metselaar, J. M., Dallinga-Thie, G. M., Mulder, W. J. M., Stroes, E. S. G., & Hamers, A. A. J. (2016). Liposomal prednisolone promotes macrophage lipotoxicity in experimental atherosclerosis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *12*(6), 1463–1470.
- Venkatesan, T., Choi, Y. W., & Kim, Y. K. (2019). Effect of an extraction solvent on the antioxidant quality of *Pinus densiflora* needle extract. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *9*(3), 193–200.
- Verardo, V., Garcia-Salas, P., Baldi, E., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., & Caboni, M. F. (2014). Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids. *Food*

- Research International*, 65(PC), 445–452.
- Victor Njoku, O., & Obi, C. (2009). Phytochemical constituents of some selected medicinal plants. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 3(11), 228–233.
- Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B. R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., & Vuorela, P. M. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 295–300.
- Vijayaraj, P., Muthukumar, K., Sabarirajan, J., & Nachiappan, V. (2013). Antihyperlipidemic activity of *Cassia auriculata* flowers in triton WR 1339 induced hyperlipidemic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65, 135–141.
- Virani, S. S., Alonso, A., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Dellings, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S. V., Ferguson, J. F., Fornage, M., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Kwan, T. W., Lackland, D. T., ... Heard, D. G. (2020). Heart disease and stroke statistics—2020 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*, 141(9), 139–596.
- Viuda-Martos, M., Fernández-Lóaez, J., & Pérez-álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635–654.
- Wang, B., Li, B. W., Li, H. W., Li, A. L., Yuan, X. C., Wang, Q., & Xiu, R. J. (2014). Enhanced matrix metalloproteinases-2 activates aortic endothelial hypermeability, apoptosis and vascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 57(4), 325–338.
- Wang, Dongdong, Özen, C., Abu-Reidah, I. M., Chigurupati, S., Patra, J. K., Horbanczuk, J. O., Józwik, A., Tzvetkov, N. T., Uhrin, P., & Atanasov, A. G. (2018). Vasculoprotective effects of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–15.
- Wang, Dongliang, Xia, M., Yan, X., Li, D., Wang, L., Xu, Y., & Jin, T. (2012). Gut Microbiota Metabolism of Anthocyanin Promotes Reverse Cholesterol Transport in Mice Via Repressing miRNA-10b Dongliang. *Circ Res*, 111(8), 967–981.
- Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants : Structure , activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12–23.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, X., Liu, Y., & Xia, M. (2012). Cyanidin-3- O - b -glucoside induces oxysterol ef flux from endothelial cells : Role of liver X receptor alpha. *Atherosclerosis*, 223(2), 299–305.
- Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., & Atungulu, G. G. (2011). Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal*, 5(1), 17–25.
- Ward, N. C., Watts, G. F., & Eckel, R. H. (2019). Statin Toxicity: Mechanistic Insights and Clinical Implications. *Circulation Research*, 124(2), 328–350.
- Weber, C., & Noels, H. (2011). Atherosclerosis : current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine*, 17(11), 1410–1422.
- Wei, T., Liu, J., Zhang, D., Wang, X., Li, G., Ma, R., Chen, G., Lin, X., & Guo, X. (2021). The Relationship Between Nutrition and Atherosclerosis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(April), 1–10.
- Wei, X., Li, S., Li, T., Liu, L., Liu, Y., Wang, H., Zhou, Y., Liang, F., Yu, X., Zang, W., Zhao, M., & Zhao, Z. (2020). Pomegranate peel extract ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats through suppressing p38MAPK/Nrf2 pathway. *Journal of Functional Foods*, 65(76), 1–10.
- Williams, J. W., Zaitsev, K., Kim, K. W., Ivanov, S., Saunders, B. T., Schrank, P. R., Kim, K., Elvington, A., Kim, S. H., Tucker, C. G., Wohltmann, M., Fife, B. T., Epelman, S., Artyomov, M. N., Lavine, K. J., Zinselmeier, B. H., Choi, J. H., & Randolph, G. J. (2020). Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression. *Nature Immunology*, 21(10), 1194–1204.
- Williamson, G. (2017). The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin*, 42(3), 226–235.
- Willis, R. B., & Allen, P. R. (1998). Improved method for measuring hydrolyzable tannins using

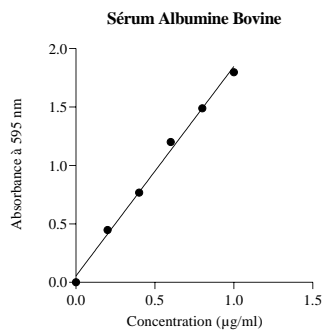
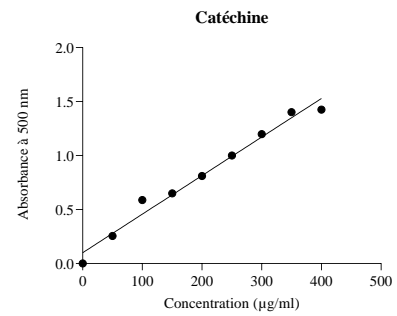
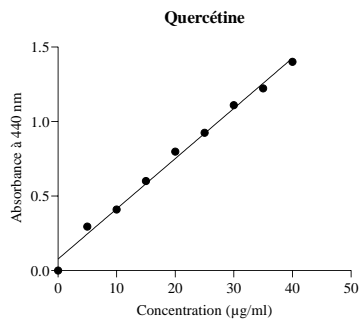
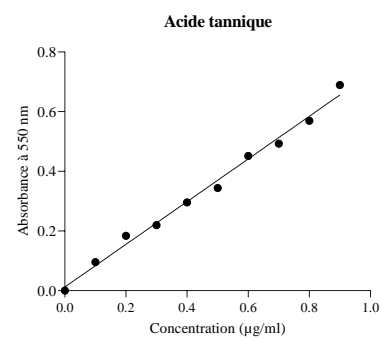
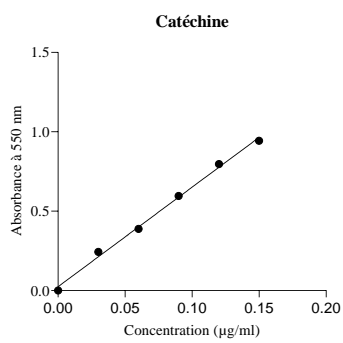
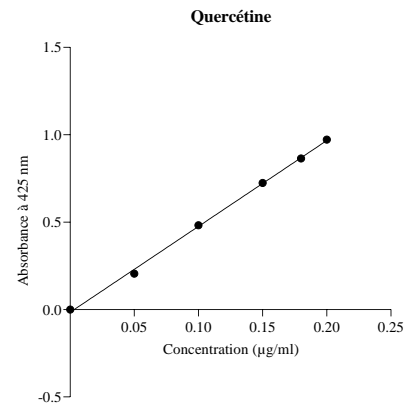
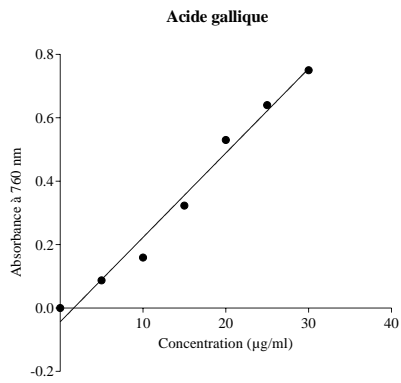
- potassium iodate. *Analyst*, 123(3), 435–439.
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99–105.
- Wolf, M. P., & Hunziker, P. (2020). Atherosclerosis: Insights into Vascular Pathobiology and Outlook to Novel Treatments. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 13(5), 744–757.
- Woo, M. H., Lee, K. O., Chung, D., Choi, J. W., Kim, S. H., & Oh, S. H. (2021). Triglyceride/HDL-Cholesterol Ratio as an Index of Intracranial Atherosclerosis in Nonstroke Individuals. *Frontiers in Neurology*, 11(January), 1–7.
- Wu, S., & Tian, L. (2017). Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*punica granatum*). *Molecules*, 22(10), 1–17.
- Wu, Y., Zhu, C. ping, Zhang, Y., Li, Y., & Sun, J. ru. (2019). Immunomodulatory and antioxidant effects of pomegranate peel polysaccharides on immunosuppressed mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 504–511.
- Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., Cao, Z., & Ji, P. (2019). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint. *Molecules*, 24(15), 1–16.
- Wysocka, A., & Zwolak, A. (2021). The relevance of noncoding dna variations of paraoxonase gene cluster in atherosclerosis-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–28.
- Xia, M., Hou, M., Zhu, H., Ma, J., Tang, Z., Wang, Q., Li, Y., Chi, D., Yu, X., Zhao, T., Han, P., Xia, X., & Ling, W. (2005). Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: The role of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -liver X receptor α -ABCA1 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 36792–36801.
- Xie, Y., Morikawa, T., Ninomiya, K., Imura, K., Muraoka, O., Yuan, D., & Yoshikawa, M. (2008). Punicanolic Acid, with Tumor Necrosis Factor- α Inhibitory Activity from the Flowers of *Punica granatum*. *Notes*, 56(11), 1628–1631.
- Xu, H., Jiang, J., Chen, W., Li, W., & Chen, Z. (2019). Vascular Macrophages in Atherosclerosis. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1–15.
- Xue, B., Yu, Y., Beltz, T. G., Guo, F., Felder, R. B., Wei, S., & Kim Johnson, A. (2021). Maternal Angiotensin II-Induced Hypertension Sensitizes Postweaning High-Fat Diet-Elicited Hypertensive Response Through Increased Brain Reactivity in Rat Offspring. *Journal of the American Heart Association*, 10(18), 1–14.
- Yang, J., Zhang, S., Henning, S. M., Lee, R., Hsu, M., Grojean, E., Pisegna, R., Ly, A., Heber, D., & Li, Z. (2018). Cholesterol-lowering effects of dietary pomegranate extract and inulin in mice fed an obesogenic diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 52, 62–69.
- Yang, Q. Q., Cheng, L. Z., Zhang, T., Yaron, S., Jiang, H. X., Sui, Z. Q., & Corke, H. (2020). Phenolic profiles, antioxidant, and antiproliferative activities of turmeric (*Curcuma longa*). *Industrial Crops and Products*, 152(May), 112561.
- Yang, X., Li, Y., Li, Y., Ren, X., Zhang, X., Hu, D., Gao, Y., Xing, Y., & Shang, H. (2017). Oxidative stress-mediated atherosclerosis: Mechanisms and therapies. *Frontiers in Physiology*, 8(AUG), 1–16.
- Yao, X., Cheng, X., Zhang, L., Yu, H., Bao, J., Guan, H., & Lu, R. (2017). Punicalagin from pomegranate promotes human papillary thyroid carcinoma BCPAP cell death by triggering ATM-mediated DNA damage response. *Nutrition Research*, 47, 63–71.
- Yin, M., Li, C., Jiang, J., Le, J., Luo, B., Yang, F., Fang, Y., Yang, M., Deng, Z., Ni, W., & Shao, J. (2021). Cell adhesion molecule-mediated therapeutic strategies in atherosclerosis: From a biological basis and molecular mechanism to drug delivery nanosystems. *Biochemical Pharmacology*, 186, 1–13.
- Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoai, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., Sawada, S., Yonemura, A., Higashi, K., Ito, T., Nakajima, K., Yamashita, T., Tomiyasu, K., Nishiwaki, M., Ohsuzu, F., & Nakamura, H. (1999). Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochemical Pharmacology*, 58(11), 1695–1703.

- Yu, D., Chen, G., Pan, M., Zhang, J., He, W., Liu, Y., Nian, X., Sheng, L., & Xu, B. (2018). High fat diet-induced oxidative stress blocks hepatocyte nuclear factor 4 α and leads to hepatic steatosis in mice. *Journal of Cellular Physiology*, 233(6), 4770–4782.
- Yu, M., Gouvinhas, I., Rocha, J., & Barros, A. I. R. N. A. (2021). Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14.
- Yuan, T., Wan, C., Ma, H., & Seeram, N. P. (2013). New phenolics from the flowers of punica granatum and their in vitro α -glucosidase inhibitory activities. *Planta Medica*, 79(17), 1674–1679.
- Zahin, M., Aqil, F., & Ahmad, I. (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punica granatum L. peel extracts. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(2), 99–107.
- Zaid, M. A., Afaq, F., Syed, D. N., Dreher, M., & Mukhtar, H. (2007). Inhibition of UVB-mediated Oxidative Stress and Markers of Photoaging in Immortalized HaCaT Keratinocytes by Pomegranate Polyphenol Extract POMx. *Photochemistry and Photobiology*, 83, 882–888.
- Zambon, A., Deeb, S. S., Brown, B. G., Hokanson, J. E., & Brunzell, J. D. (2001). Common Hepatic Lipase Gene Promoter Variant Determines Clinical Response to Intensive Lipid-Lowering Treatment Alberto. *Circulation*, 103(6), 792–799.
- Zambon, A., Deeb, S. S., Pauletto, P., Crepaldi, G., & Brunzell, J. D. (2003). Hepatic lipase : a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr Opin Lipidol*, 14(2), 179–189.
- Zanotti, I., Dall’Asta, M., Mena, P., Mele, L., Bruni, R., Ray, S., & Rio, D. Del. (2015). Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food Funct*, 16(1), 13–31.
- Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., & Mars, M. (2012). Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (Punica granatum L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 40(1), 81–89.
- Zarei, M., Azizi, M., & Bashir-Sadr, Z. (2011). Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (Punica granatum L.) fruit during ripening. *Fruits*, 66(2), 121–129.
- Zeghad, N., Ahmed, E., Belkhir, A., Heyden, Y. Vander, & Demeyer, K. (2019). Antioxidant activity of Vitis vinifera, Punica granatum, Citrus aurantium and Opuntia ficus indica fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*, 5(4), e01575.
- Zemaitis, M. R., Boll, J. M., & Dreyer, M. A. (2021). Peripheral Arterial Disease. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Zernecke, A., Winkels, H., Cochain, C., Williams, J. W., Wolf, D., Soehnlein, O., Robbins, C. S., Monaco, C., Park, I., McNamara, C. A., Binder, C. J., Cybulsky, M. I., Scipione, C. A., Hedrick, C. C., Galkina, E. V., Kyaw, T., Ghosheh, Y., Dinh, H. Q., & Ley, K. (2020). Meta-analysis of leukocyte diversity in atherosclerotic mouse aortas. *Circulation Research*, 127(3), 402–426.
- Zhai, X., Zhu, C., Zhang, Y., Sun, J., Alim, A., & Yang, X. (2018). Chemical characteristics, antioxidant capacities and hepatoprotection of polysaccharides from pomegranate peel. *Carbohydrate Polymers*, 202, 461–469.
- Zhang, S., Li, L., Wang, J., Zhang, T., Ye, T., Wang, S., Xing, D., & Chen, W. (2021). Recent advances in the regulation of ABCA1 and ABCG1 by lncRNAs. *Clinica Chimica Acta*, 516, 100–110.
- Zhang, W. W., Duan, X. J., Huang, H. L., Zhang, Y., & Wang, B. G. (2007). Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from Symphyocladia latiuscula (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology*, 19(2), 97–108.
- Zhang, Yifan, Wang, Y., Ding, J., & Liu, P. (2022). Efferocytosis in multisystem diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 25(1), 1–15.
- Zhang, Yunyue, Wu, S., Qin, Y., Liu, J., Liu, J., Wang, Q., Ren, F., & Zhang, H. (2018). Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 240, 1072–1080.
- Zhao, S., Li, J., Wang, L., & Wu, X. (2016). Macrophages, Pomegranate Peel Polyphenols Inhibits Lipid

- Accumulation and Enhances Cholesterol Efflux in raw264.7. *Food and Function*, 7(7), 1–27.
- Zhao, X., Wang, D., & Qin, L. (2021). Lipid profile and prognosis in patients with coronary heart disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC Cardiovascular Disorders*, 21(1), 1–15.
- Zheng, S., Huang, H., Li, Y., Wang, Y., Zheng, Y., Liang, J., Zhang, S., Liu, M., & Fang, Z. (2021). Yin-xing-tong-mai decoction attenuates atherosclerosis via activating PPAR γ -LXR α -ABCA1 / ABCG1 pathway. *Pharmacological Research*, 169, 1–14.
- Zhou, D. D., Luo, M., Shang, A., Mao, Q. Q., Li, B. Y., Gan, R. Y., & Li, H. Bin. (2021). Antioxidant Food Components for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms, and Clinical Studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–17.
- Zimmerman, B., Kundu, P., Rooney, W. D., & Raber, J. (2021). The effect of high fat diet on cerebrovascular health and pathology: A species comparative review. *Molecules*, 26(11), 1–21.
- Zivkovic, V. (2016). *Détéction des plaques d'athérosclérose carotidienne calcifiées sur CBCT grand champ*.
- Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5032–5039.

ANNEXES

ANNEXE 1



ANNEXE 2

Tableau 1. Détermination de la DL50 de l'extrait phénolique de l'écorce (EPE) par l'analyse en suivant la méthode de probits méthode de moindres carrés (distribution normale).

Dose (mg/Kg)	Nombre des rats	% de mort par EPE
0	5	0
300	5	0
500	5	0
1000	5	0
1500	5	20
2000	5	60

Tableau 2. Détermination de la DL50 de l'extrait phénolique des arilles (EPA) par l'analyse en suivant la méthode de probits méthode de moindres carrés (distribution normale).

Dose (mg/Kg)	Nombre des rats	% de mort par EPA
0	5	0
300	5	0
500	5	0
1000	5	0
1500	5	0
2000	5	0

ANNEXE 3

Composition de l'alimentation des animaux

Céréales, Mais, Orge

Issues de blé : Son, Fibres

Tourteaux d'oléagineux : Soya, Tso1

Composé minéral vitaminé

Mélasse

Garanties pour cent

Minimum

Matières protéiques brutes	15
Matières grasses	2
Phosphore	0.30

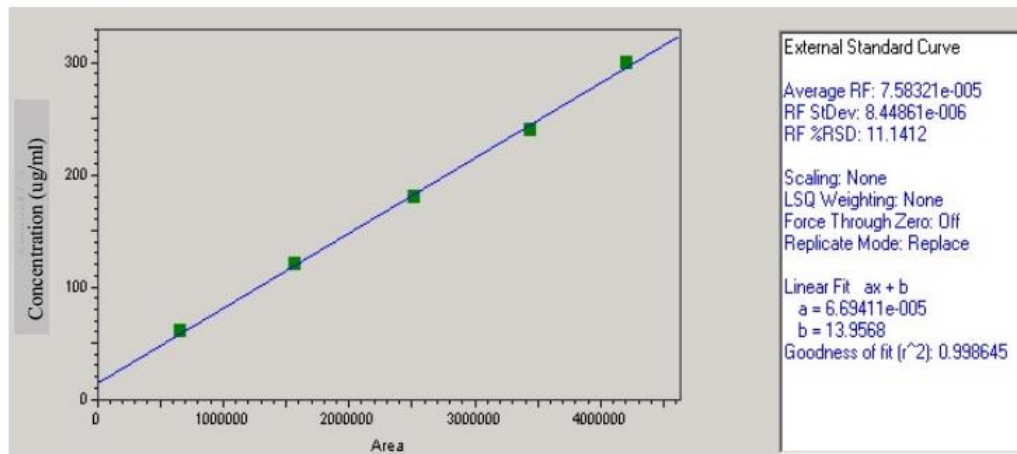
Maximum

Matières minérales	9
Cellulose brute	15
Calcium	1

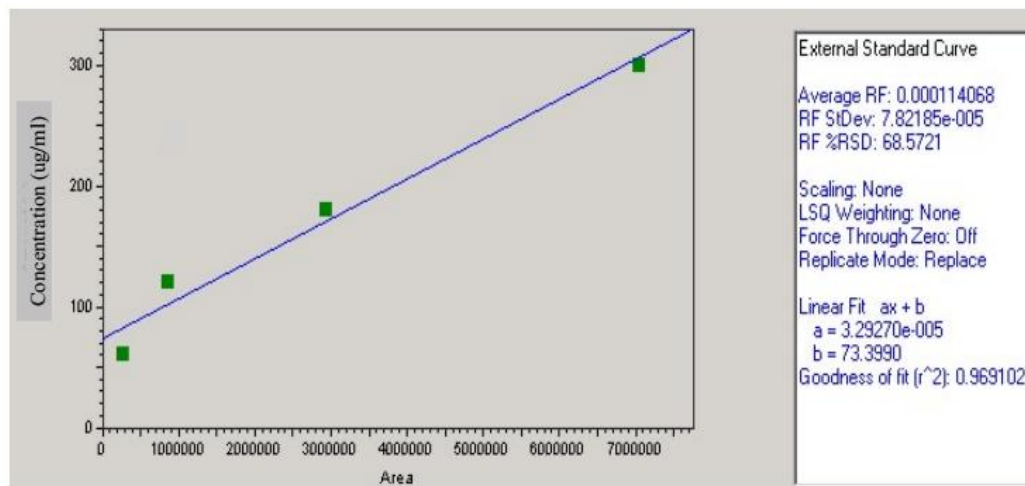
Vitamines UI/100 Kg

Vitamine A	1000.000
Vitamine D3	150
Vitamine E	2

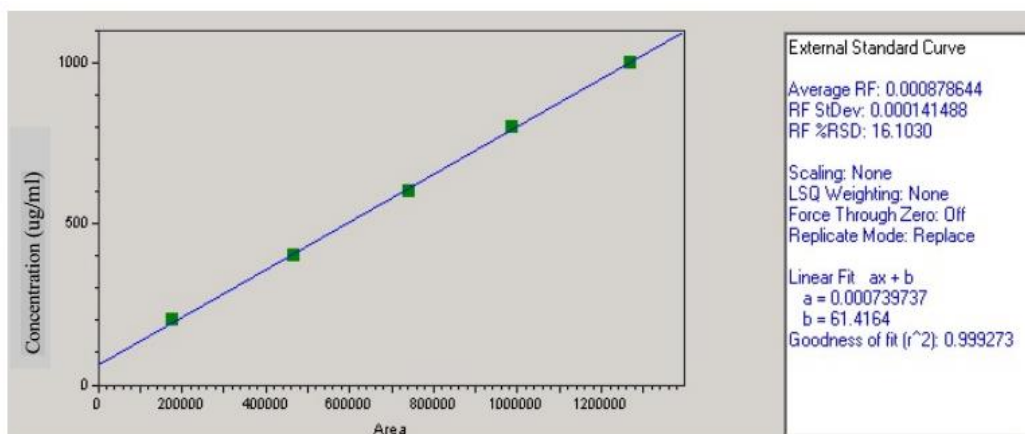
ANNEXE 4

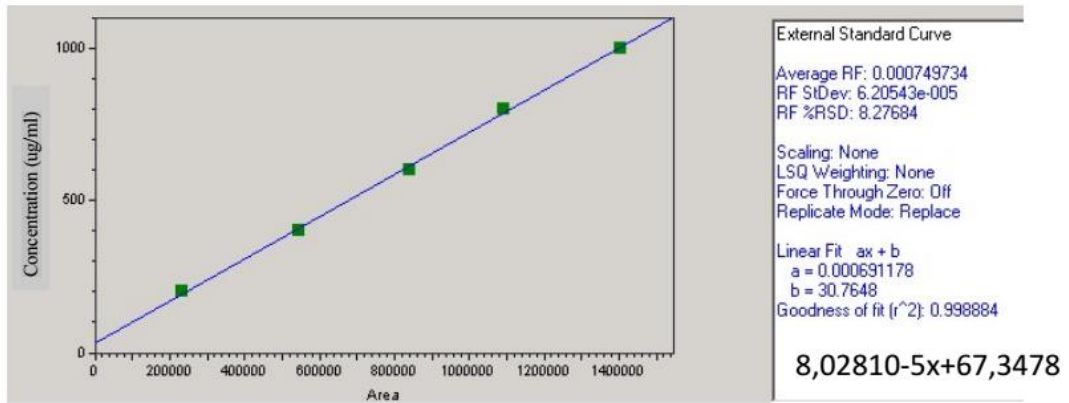
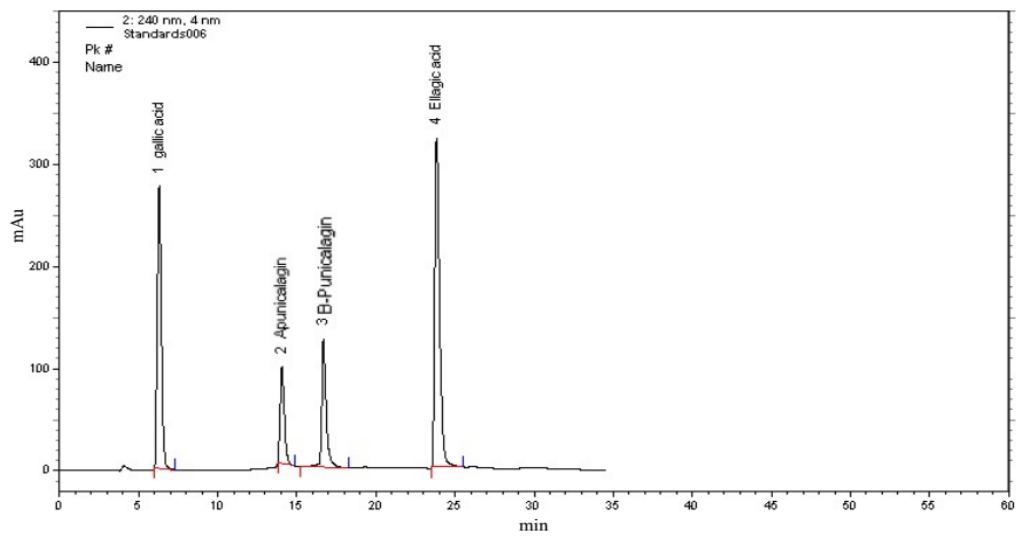


Gallic acid Standard curve

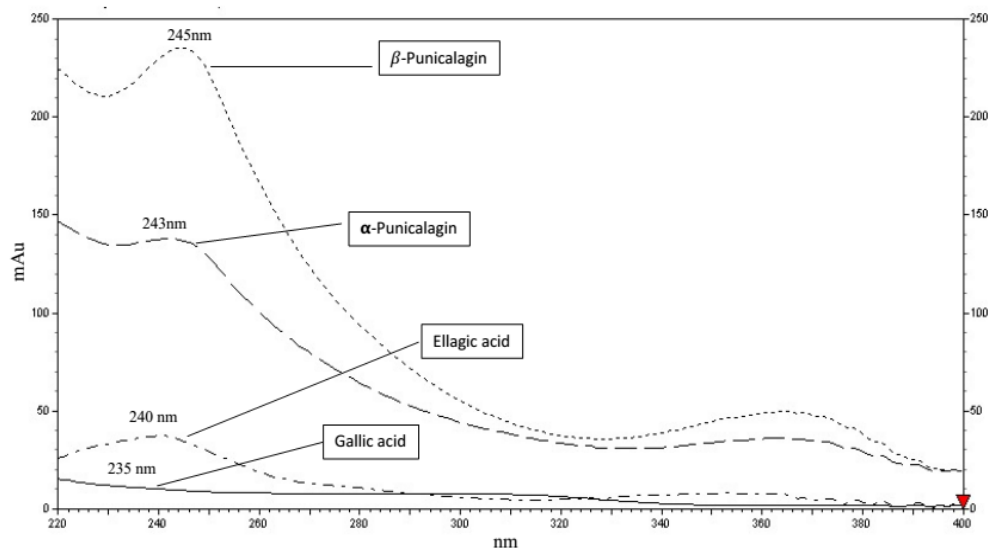


Ellagic acid Standard curve

 α -Punicalagin Standard curve

 β -Punicalagin standard curve

HPLC-DAD Standard mixture peak analysis



UV absorption spectro-chromatogram of PPPE

