



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi -Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option: Biochimie Appliquée

Thème :

Estimation du potentiel antioxydant et antimicrobien de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade.

Présenté par :

BOUSATLA Mabrouka

ZARAA Amira

Devant le jury :

Mr.GOUDJIL Tahar	MCB	Université de Tébessa	Président
Mr.DJABRI Belgacem	Pr.	Université de Tébessa	Rapporteur
Mr. ZOUAOUI Nassim	MAA	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance: 22/06/2020

Dédicaces

A mes très chers parents, source d'amour et de soutien inépuisables, aucune
dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma vive
gratitude, mon intime attachement et ma profonde affection envers vous.

Je ne saurai et je ne pourrai vous remercier pour tout ce que vous avez
fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent.

A mes chers sœurs et frères ainsi que leurs petites familles

Bonsatla mabrouka

Dédicaces

A mes parents

Ma très chère mère adorable qui ma soutenue pendant toutes mes longues années d'étude.

Mon très cher père qui m'a permis de continuer mes études dans les meilleurs conditions et qui m'a appris à ne jamais baissé les bras.

A ma famille

A mes chers frères : **Amir, SeifEddin ,Rami** qui m'ont toujours encouragé et soutenu.

Zaràa Amira

Remerciements

Avant toute chose, Louanges à Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage et la patience tout au long de notre parcours d'étude.

Un merci bien particulier est adressé à notre encadreur, **Professeur DJABRI Belgacem**, d'avoir accepté de diriger ce travail et aussi pour ses précieux conseils. Il nous a consacré énormément de temps, il nous a transmis une partie de son savoir avec beaucoup de patience et de rigueur, malgré ces multiples occupations.

Nos vifs remerciements aux membres de jury : **Dr.GOUDJIL Tahar** pour avoir accepté de présider le jury et **Mr. ZOUAOUI Nassim** pour avoir pris le temps d'évaluer et examiner ce mémoire

Nous n'oublions pas de remercier **Dr.BENHADJ Mabrouk** pour son aide et ses conseils tout au long de ce travail.

Un grand remerciement aux techniciennes de laboratoires : **Souad et Hacène** pour toute l'aide et l'appui qu'ils nous ont offerts.

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

ملخص

لعدة سنوات، إهتمت العديد من الأعمال بالنشاط العلاجي للنباتات الطبية المستخدمة في الطب التقليدي لأنها تحتوي على العديد من الجزيئات النشطة ذات الأنشطة المختلفة. تهدف دراستنا الإطارية إلى دراسة التأثيرات المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا والفطريات لمستخلص الميثانول لقشرة الرمان (*Punica granatum L.*)

L'EMG تم الحصول عليه عن طريق تعقيم 100 جم في 1000 مل من الميثانول متبوعًا بتبخير هذا المذيب. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام تقنيات الحد من الجذور الحرة DPPH وقوة الاختزال للحديد الحديدي (FRAP)، وتم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا والمضاد للفطريات للمستخلص على 03 سلالة بكتيرية (*E. coli, M. luteus et S. aureus*) وفطرتين (*C. albicans L24 et L36*) بواسطة طريقة الانتشار على القرص.

كان العائد EMG 35.43%. تظهر نتائج النشاط المضاد للأكسدة أن الطاقة المضادة للأكسدة لفيتامين C كانت أعلى بكثير من تلك الموجودة في خلاصتنا. تم العثور على نسبة تثبيط الجذور الحرة DPPH لتكون أقل بكثير من فيتامين C (43.61%).

C مقابل 91.86 على التوالي). وهكذا، كان IC50 للمستخلص - 1232.44 ميكروغرام / مل بينما كان فيتامين C 114.31 ميكروغرام / مل. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت طريقة FRAP أن الامتصاص المسجل لفيتامين C كان أعلى من EMG (1.995 نانومتر مقابل 0.9664 نانومتر على التوالي). تشير نتائج النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات إلى أن المستخلص له نشاط مثبت على جميع السلالات المختبرة.

تؤكد نتائجنا أن I'EMG يتمتع بأنشطة بيولوجية تبرر استخدامه كبديل لبعض المواد المضادة للأكسدة ومضادات حيوية

معينة

الكلمات المفتاحية : مستخلص قشرة الرمان، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات

Abstract

For some years several works have been interested in the therapeutic activity of medicinal plants used in traditional medicine because they contain several active molecules with various activities. Our framework study aimed to study the antioxidant, antibacterial and antifungal effects of methanolic extract (EMG) from pomegranate bark (*Punica granatum L.*)

The EMG was obtained by maceration of 100 g in 1000 ml of methanol followed by the evaporation of this solvent. The antioxidant activity was evaluated using the techniques of reduction trapping of the free radical DPPH and the reducing power of ferric iron (FRAP). The antibacterial and antifungal activities of EMG were tested on 03 bacterial strains (*E. coli*, *M. luteus* and *S. aureus*) and 2 fungi (*C. albicans* L24 and L36) by the disc diffusion method.

The EMG yield was 35.43%. The results of the antioxidant activity show that the antioxidant power of Vit C was much higher than that of our extract. The percentage of inhibition of the free radical DPPH from EMG was much lower than that of vit C (43.61% vs 91.86 respectively). Thus, the IC₅₀ of EMG was 1232.44 µg / ml while that of vit C was 114.31 µg / ml. In addition, the FRAP method has shown that the absorbance recorded for vit C was higher than that of EMG (1.995 nm vs 0.9664 nm respectively). The results of antibacterial and antifungal activity indicate that the extract has inhibitory activity on all the strains tested.

Our results confirm that EMG is endowed with biological activities which justify its use as an alternative to certain antioxidant substances and certain antibiotics

Key words: EMG, Antioxidizing, Antifongique, Antibacterial,

Résumé

Depuis certaines années plusieurs travaux se sont intéressés à l'activité thérapeutique des plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules actives ayant des activités diverses. Notre étude s'inscrivant dans ce cadre avait pour objectif d'étudier les effets antioxydant, antibactérien et antifongique de l'extrait méthanolique (EMG) de l'écorce de grenade (*Punicagranatum*L.)

L'EMG a été obtenu par macération de 100g de poudre de l'écorce de grenade dans 1000 ml de méthanol pendant 72 h suivie par l'évaporation du ce solvant. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les techniques de réduction piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP). Les activités antibactérienne et antifongique de l'EMG ont été testées sur 03 souches bactériennes (*E. coli*, *M. luteus* et *S. aureus*) et 2 champignons (*C. albicans* L24 et L36) par la méthode de diffusion sur disque.

Le rendement en EMG était de 35,43%. Les résultats de l'activité antioxydante montrent que le pouvoir antioxydant de la Vit C était largement supérieur à celui de notre extrait. Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de l'EMG s'avérait largement inférieur à celui de la vit C (43,61 % vs 91,86 respectivement). Ainsi, L'IC₅₀ de l'EMG était de 1232,44 µg/ml alors que celle de la vit C était de 114,31 µg/ml. Par ailleurs, la méthode de FRAP a montré que l'absorbance enregistré pour la vit C était supérieure à celle de l'EMG (1,9995 nm vs 0,9664 nm respectivement). Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique indiquent que l'extrait possède une activité inhibitrice remarquable sur toutes les souches testées.

Nos résultats confirment que l'EMG est doué d'activités biologiques qui justifient son utilisation en alternative à certaines substances antioxydante et certains antibiotiques.

Mot clés : EMG, Activité antioxydant, Activité antibactérien, Activité antifongique

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
01	Composition chimique et valeur nutritionnelle de la portion comestible de grenade	09
02	Espèces réactives à l'oxygène primaires et secondaires	11
03	Modes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols	29
04	Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction	34
05	Liste d'appareils et réactifs utilisés pour l'activité anti-DPPH	36
06	Liste d'appareils et réactifs utilisé dans le test du FRAP	38
07	Matériels de l'activité antibactérienne	39
08	Souches bactériennes utilisées	40
09	Matériels de l'activité antifongique	42
10	Détermination du diamètre d'inhibition (mm) de l'EMG contre certaines souches bactériennes	49
11	Détermination du diamètre d'inhibition (mm) de l'EMG contre certaines souches de levures	51

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Fleurs et fruits du Grenadier (<i>Punica granatum L</i>) (Flora)	05
02	Arbre de <i>Punicagranatum</i>	05
03	Feuilles du <i>Punicagranatum</i>	06
04	Fleur du <i>Punicagranatum</i>	06
05	Fruits du grenadier	07
06	Principauxconstituants de différentes parties de la grenade ou de leur extrait	08
07	Résumé des sources exogènes et endogènes des radicaux libres	13
08	Réseau des antioxydants	15
09	Mode d'action des antibiotiques	17
10	Cibles des différents antifongiques	22
11	Acide gallique	23
12	Acide ellagique	23
13	Umbelliférone	24
14	Scopolétine	24
15	Squelette de base des flavonoïdes	25
16	Squelette de Flavonols	26
17	Poudre d'écorce de <i>Punicagranatum</i>	33
18	Procédure d'extraction	34
19	Réaction de testDPPH(2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl)	35
20	La réaction de test FRAP (Ferricreducingantioxydant power)	37
21	Préparation des boîtes de pétri et derepiquage des bactéries jeunes(photos personnelle)	41
22	Pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations d'extrait de M.G du <i>P.granatum</i> etvit.C.	45
23	Détermination de la valeur IC ₅₀ de la vitamine C (orange) et de l'extrait (bleue)	46
24	Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'acide ascorbique et extraitméthalonique de <i>P. granatum</i> avec le temps	48
25	Résultats des tests antibactériens de l'EMG vis-à-vis des bactéries : <i>E. coli</i> , <i>S. aureusetMicoro</i> (Photo personnelle).	50
26	Résultats des tests antifongiques de l'EMG vis-à-vis des souches étudiées : L24 et L36. (Photo personnelle)Acide gallique	51

Liste des abréviations et symboles

µg : microgramme

Abs : Absorbance.

ADN : Acide désoxyribonucléiques.

ATCC : American type culture collection.

ATP : Adénosine triphosphate..

CI50 : Concentration inhibitrice 50%.

CMI : concentrations minimales d'inhibitions

CBM : concentrations bactéricide minimale

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EMG : Extraitmethanolique de l'ecorce de grenade

E.coli :Escherichia coli

FRAP: Ferric reducing antioxidant power.

g : gramme

GP_x:glutathionperoxydase

h : heure

H⁺ : proton

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

mg : milligramme

MH : Mueller-Hinton.

MH: Mueller Hinton

Min :minute

ml : millilitre

nm :nanomètre

NO° :Monoxyded'azote.

O₂⁻ :Radical superoxyde.

O₂[°] :Anion superoxyde.

OH° :Radical hydroxyle.

ONOO : Peroxynitrite.

R : Rendement.

ROS: Radicaux libres oxygénés

RO : Alkoxyles.

ROOH : Peroxydes.

SOD : Super oxydes dismutases.

UV : ultra violet

Vit : vitamine

Vit C : Vitamine C

Dédicace	
Remerciment	
ملخص	
Abstract	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations et symboles	
Sommaire	
INTRODUCTION	01
PARTIE I : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES	
I.1.Rappels bibliographique sur la grenade et son écorce	04
I.1.1.Généralité sur la grenade	04
I.1.2.Classification Botanique	05
I.1.3.Principales parties du grenadier	06
I.1.3.1.Feuilles	06
I.1.3.2. Fleurs	06
I.1.3.3. Fruits	07
I.1.4.Constituants des extraits de certaines parties des grenades	07
I.1.5.Intérêt de la grenade	08
I.1.5.1.Intérêt nutritionnel	08
I.1.4.2.Intérêt thérapeutique	09
I.2.Activités antioxydantes	10
I.2.1.Stress oxydant	10
I.2.2.Radicaux libre	10
I.2.2.1.Espèces réactives de l'oxygène	10
I.2.2.2.Production des radicaux libres	11

I.2.2.2.1.Synthèse d'origine endogène	11
I.2.2.2.2.Synthèse d'origines exogènes	12
I.2.2.3.Conséquences du stress oxydant	13
I.2.2.4.Activité antioxydante	13
I.2.2.4.1.Antioxydants endogènes	14
I.2.2.4.2.Antioxydants exogènes	14
I.2.2.Mode d'action des antioxydants	15
I.3.Activités antibactériennes	16
I.3.1.Définitions	16
I.3.2.Origine d'antibiotique	16
I.3.3.Cibles bactériennes des antibiotiques	16
I.3.4.Notion du bactériostatique et du bactéricide	17
I.3.4.1.Effet bactériostatique	17
I.3.4.2.Effet bactéricide	17
I.3.5.Résistance microbienne aux antibiotiques (Auto-antibio-résistance)	18
I.4.Activités antifongiques	19
I.4.1.Classes de composés et leurs activités antifongiques	19
I.4.1.1.Terpénoïdes	19
I.4.1.2. Saponines	19
I.4.1.3.Composés phénoliques	20
I.4.1.4.Alcaloïdes	20
I.4.1.5.Protéines et peptides	20
I.4.2.Mécanismes d'action antifongiques	20
I.4.2.1.Inhibition de la formation de paroi cellulaire	20
I.4.2.3.Rupture de la membrane cellulaire	20
I.4.2.3.Dysfonctionnement de la mitochondrie fongique	21
I.4.2.4.Inhibition de la division cellulaire	21
I.4.2.5.Inhibition de la synthèse ARN / ADN ou synthèse protéique	21
I.4.2.6.Inhibition des pompes d'efflux	21

I.4.3.Evaluation de l'activité antifongique	22
I.4.3.1.Détermination l'indice antifongique	22
I.4.3.2.Détermination des concentrations minimale inhibitrices (CMI)	22
I.4.3.3.Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VCM)	22
I.5.Composition et activités biologiques de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade	23
I.5.1.Compositions de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade	23
I.5.1.1.Acides phénolique	23
I.5.1.2.Flavonoïdes	24
I.5.1.3.Tanins	26
I.5.2.Rôle et intérêt des composés phénoliques	27
I.5.3.Activités biologique de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade	27
I.5.3.1.Activités antioxydantes	27
I.5.3.2.Activités antimicrobiennes	28
I.5.3.3.Activité antifatigue	29
I.5.3.4.Activité antidiabétique	29
I.5.3.5.Activité cicatrisante	30
I.5.3.6.Action anticancéreuse	30
PARTIE II : MATERIELES ET METHODES	
II.1.Matériel végétal	33
II.1.1.Matériel d'extraction	34
II.1.2.Procédé d'extraction	34
II.1.3.Calcul du rendement d'extrait	35
II.3.Evaluation de l'activité biologique	35
II.3.1.Evaluation de l'activité antioxydante	35
II.3.1.1.Test d'activité anti DPPH	35
II.3.1.1.1.Matériel et réactif	36
II.3.1.1.2.Mode opératoire	36

II.3.1.1.3.Détermination de pourcentage d'inhibition	36
II.3.1.1.4.Détermination de l'IC50	36
II.3.1.2.Test de la réduction du fer (FRAP)	37
II.3.1.2.1.Matériel et réactif	38
II.3.1.2.2.Mode d'opérateur	38
II.3.2.Evaluation de l'activité antibactérienne	39
II.3.2.1.Matériel	39
II.3.2.2.Milieu de culture	40
II.3.2.3.Protocol expérimental	40
II.3.2.4.Lecture	41
II.3.3.Evaluation de l'activité antifongique	42
II.3.3.1.Matériel	42
II.3.3.2.Milieu de culture	42
II.3.3.3.Protocol expérimental	43
II.3.3.4.Lecture	43
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	
III.1.Rendement de l'extraction	45
III.2.Activité antioxydante	45
III.2.1.Pourcentage d'inhibition de radical DPPH	45
III.2.2.Détermination de l'IC50 (Concentration inhibitrice 50%)	46
III.3.Etude cinétique de la réaction par le test de réduction du fer FRAP	47
III.4.Activité antibactérienne d'extrait méthalonique de <i>P. granatum</i>	49
III.5.Activités antifongique d'extrait méthalonique de <i>P. granatum</i>	51
CONCLUSION	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

Introduction

Ces dernières années, la recherche sur les plantes médicinales a attiré une attention particulière parce que ces plantes sont riches en métabolites secondaires (composés phénolique, tanins, flavonoïdes...), qui ont plusieurs propriétés antioxydants et antimicrobiennes qui peuvent construire une base de traitement ou de complément de traitement des maladies humaines (Cowan, 1999 ; Dahanukar et al., 2000). La grenade (*Punica granatum* L.) est un fruit antique avec des antécédents médicaux. Sa peau épaisse, de même que ses cloisons internes sont riches en tanins ce qu'il lui confère un goût acres et amères. Les études ont montré que les antioxydants trouvés dans la grenade ont des effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire (Rosenblat et al., 2006).

De nombreuses affections humaines incluent le stress oxydatif, local ou général, dans leur pathogenèse. Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydant est le facteur déclenchant original (c'est le cas des cancers, des maladies neurodégénératives ...). Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires (c'est le cas de maladies infectieuses comme le SIDA, le diabète, l'insuffisance rénale...). Il semble donc important de rechercher constamment de nouveaux antioxydants qui peuvent agir dans la prévention des maladies dégénératives à la condition d'être apportées à doses modérées car la production basale de radicaux libres est indispensable à de nombreuses fonctions et ne doit pas être supprimée (Bennamara, 2017). L'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans divers spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales (Sanchez-Moreno, 2002 ; Marc et al., 2004; Huang et al., 2005).

La découverte des antibiotiques (antibactérien et antifongique) constituait une véritable révolution dans la lutte les maladies infectieuses. Cependant, la consommation inappropriée et l'utilisation abusive d'antibiotique ont accéléré l'apparition de bactéries multi résistantes qui constituent actuellement un réel problème. La plupart des infections, qu'elles soient bénignes ou graves sont de plus en plus difficiles à traiter (OMS, 2005). Les chercheurs ont mené à trouver des principes actifs qui donnent aux plantes médicinales leurs effets thérapeutiques après plusieurs études *in vitro*. Ces ressources naturelles deviennent alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces (Wright et Sutherland, 2007).

Notre étude a pour objectif d'investiguer les activités antioxydantes et antibactériennes de la peau de grenade. Dans ce présent travail, l'étude sera divisée en deux parties :

- Une partie bibliographique dans laquelle seront rapportées certaines informations de base nécessaires pour la compréhension du travail expérimental.
- Une partie expérimentale expliquant le matériel utilisé et la méthodologie adoptée ainsi que la présentation des résultats et leur discussion.

I.1. Rappels bibliographique sur la grenade et son écorce

I.1.1. Généralité sur la grenade

Le grenadier est un arbre fruitier auto-fertile qui appartient à la famille des Punicaceae comprenant trois espèces différentes : *Punica protopunica*, *Punica nana* et *Punica granatum*. Il est connu sous le nom de Pomegranate dans la langue anglaise, Granados pour la langue espagnole (**Ben Abdennebi, 2012**). La grenade est globalement cultivée dans de nombreuses régions géographique, en répondant aux besoins nutritionnels et médicinales des populations des différentes pays comme les Pays du bassin méditerranéen, l'Iran, l'Inde, la Chine, le Chili, les Etats-Unis et plus récemment l'Afrique du Sud (**Al-Said et al., 2009 ; Holland et al., 2009 ; Fawole et al., 2011**).

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2,5m de haut, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux (**Lairini et al., 2014**). La grenade, est une baie ronde, de la taille d'une pomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre, très colorée, généralement de couleur rouge vif, à blanc jaunâtre, ou jaune foncé marbrée ou encore de violet très foncé, selon l'espèce et le degré de maturité du fruit (**Sharraf et Hamed, 2012**).

Les graines du fruit, qui constituent la partie comestible, sont enveloppées dans des turnes séparées par des cloisons ténues et membraneuses de couleur blanche jaunâtre (**Qnais et al., 2007**). Selon **Yasoubi et al. (2007)**, Le jus et la peau de grenade contiennent des quantités de polyphénols comme les tanins ellagique, l'acide ellagique et l'acide gallique il a été utilisé dans la préparation de formule cosmétique, thérapeutique et alimentaire. La peau de grenade est une bonne source d'antioxydants. Des études faites sur la composition de la grenade, ont signalé la richesse de ses différentes parties en de nombreux composés chimiques ayant un grand pouvoir préventif et curatif.

La grenade est un fruit qui est largement utilisée dans l'alimentation humaine, dans l'industrie telle que le tannage et l'extraction de jus, confiture, sirop, sauc et dans des multiples applications thérapeutiques aussi bien en médecine traditionnelle que dans la recherche médicale (**Oukabli, 2004**).

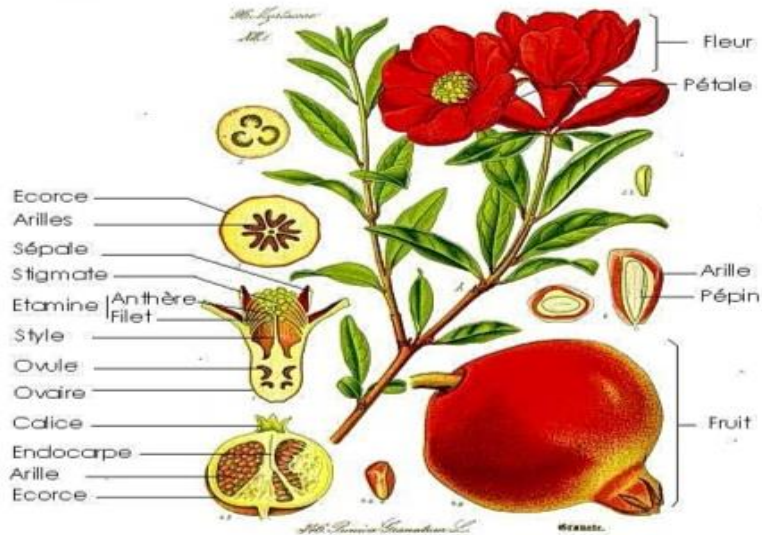


Figure 01 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum L*) (Flora) (Von Deutschland et Schweiz. 1885).

I.1.2. Classification Botanique :

Le grenadier a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. (Spichiger et al., 2009). Telle est Cette classification

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



Figure 02 : Arbre de *Punica granatum*.

La famille des Punicacées n'existe plus, dans cette nouvelle classification. Alors le grenadier appartient à la famille des Lythracées, qui comportant 30 genres et 600 espèces (**Spichiger, Savolant et al., 2004**).

I.1.3. Principales parties du grenadier

I.1.3.1. Feuilles

Les feuilles opposées à court pétiole, ovales, entières, vertes brillantes, sont opposées. Elles peuvent avoir une disposition alterne sur les rejets ou être en touffes sur les pousses courtes. Elles sont glabres sur les deux faces. La face supérieure est vert foncé et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante. (**Godet, 1991**). Elles ne possèdent pas de stipule.



Figure 03 : Feuilles du *Punica granatum*.

I.1.3.2. Fleurs

Les fleurs portent le nom de balaustes, elles sont très ornementales. Les fleurs sèches sont sans odeur. Elles ont une saveur âpre et astringente et donnent à la salive une couleur violacée. Les fleurs rouges, pourpres ou grenats sont solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de 2 ou 3. (**Fabre et Ermosilla, 2008**).



Figure 04 : Fleur du *Punica granatum*

I.1.3.3. Fruits

Le fruit du grenadier, est une baie ronde, cortiquée, c'est-à-dire à épicarpe cutinisé et dur, de taille d'une pomme ou d'une oronge, de 2 à 12 cm de diamètre. Très coloré, généralement de couleur rouge vif, peut avoir une peau de teinte blanc jaunâtre, ou jaune foncé ou encore violet très foncé. Elle est surmontée des restes du calice, forment une couronne dentée, qui la rend facilement identifiable. Son péricarpe, coriace et épais, est non comestible (**Elodie, 2009**). Cette baie garde de nombreuses graines dans des loges, séparées par des cloisons ténues et membraneuses. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit.

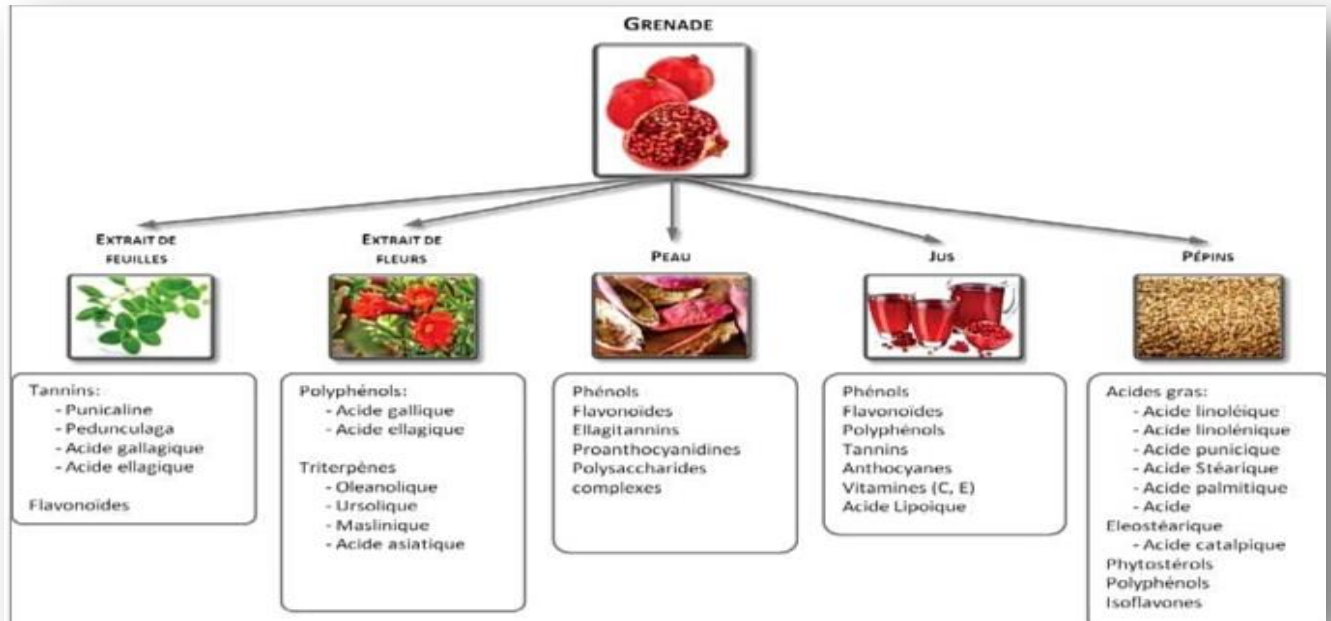
L'écorce du fruit du grenadier est Appelée malicorium. Il s'agit de la partie dure du fruit. Elle est utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtres sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente. (**Planchon et Collin, 1875**).



Figure 05 : Fruits du grenadier.

I.1.4. Constituants des extraits de certaines parties des grenades

De manière générale, la composition de la partie comestible de la grenade est bien décrite. En ce qui concerne la peau du fruit et les pépins, seules certaines classes de molécules ont été relativement bien étudiées. Chacun de ses compartiments possède des constituants spécifiques (Figure 06) dont les teneurs dépendent de la variété, la saison, le stade de maturité, ainsi que du lieu géographique et des conditions de culture (**Gil, Tomas-Barberan et al., 2000**).



Figures 06 : Principaux constituants de différentes parties de la grenade ou de leur extrait (Figure modifiée de (Al-Muammar and Khan, 2012))

I.1.5. Intérêt de la grenade

I.1.5.1. Intérêt nutritionnel

La grenade est un fruit de valeur nutritionnelle élevée, elle est très proche de la figue fraîche et de la mangue par sa valeur énergétique et sa teneur en glucides. Elle est très juteuse et sucrée, mais la présence d'acide citrique la rend également acidulée. La grenade est aussi une source non négligeable de vitamine C. Cette vitamine antioxydante et antifatique, contribue à la santé des os, des cartilages, des dents et des gencives. De plus, elle protège contre les infections, favorise l'absorption du fer contenu dans les végétaux et accélère la cicatrisation.

Ce fruit fournit aussi de nombreuses vitamines du groupe B, et plus particulièrement de la vitamine B6, également connue sous le nom de pyridoxine. Cette dernière fait partie des coenzymes qui participent au métabolisme des protéines et des acides gras, ainsi qu'à la fabrication de neurotransmetteurs. De plus, elle collabore à la fabrication de globules rouges. Elle est aussi nécessaire à la transformation du glycogène en glucose et contribue au bon fonctionnement du système immunitaire. Enfin, cette vitamine joue un rôle dans la formation des cellules nerveuses.

La grenade renferme également de nombreux oligo-éléments et minéraux, tels que le potassium, phosphore, calcium, magnésium, fer, zinc et cuivre. La grenade, à condition d'en

consommer les graines, est très riche en fibres insolubles contenues dans le tégument de ces graines (Benmeziane et Bedja, 2012).

Tableau 01: composition chimique et valeur nutritionnelle de la portion comestible de grenade (Storey, 2007).

Constituants	Quantité par 100g
Eau (g)	80 à 84,4
Protéines (g)	0,5 à 0,95
lipides(g)	0,3 à 0,9
Glucides (g)	16,4
Fibres (g)	0,2 à 0,6
Cendres(g)	0,36 à 0,73
Calcium (mg)	3 à 12
Phosphore (mg)	8
Fer (mg)	0,3 à 1,2
Sodium (mg)	3
Potassium (mg)	259
Carotènes (mg)	0
Thiamine(B1)(mg)	0,03
Riboflavine(B2)(mg)	0,03
Acide ascorbique (mg)	4 à 6
Acide citrique (mg)	0,46 à 3,
Acide borique (mg)	6 0,005

I.1.4.2. Intérêt thérapeutique

A été utilisé depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques. En médecine Ayurvedique, le grenadier est considéré comme « une pharmacie en soi » et il a été utilisé comme agent antiparasitaire, un « tonique sanguin » et pour traiter les aphtes, les diarrhées et les ulcères. Le grenadier a servi aussi de remède pour le diabète dans le système Unani de la médecine pratiquée au Moyen Orient et en Inde (Jurenka, 2008).

Les propriétés thérapeutiques potentielles du grenadier sont très variées et incluent traitement et prévention du cancer, les maladies cardiovasculaires, diabète, dysfonctionnement érectile et protection contre les radiations ultraviolettes. Ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydantes, anticarcinogénique, anti-inflammatoire et antidiabétique du grenadier (Jurenka, 2008).

I.2. Activités antioxydantes

I.2.1. Notions générale

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006 ; Droge, 2002). Les systèmes anti oxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre et al ; 2005), La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu Intracellulaire ou extracellulaire (**Bonnefont- Rousselot D et al., 2003**)

I.2.2. Radicaux libre

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possède un électron libre c'est-à-dire non apparié dans leur périphérique. Ces radicaux vont se stabiliser en acceptant un électron, en s'arrachant à une autre molécule qui devient alors déséquilibrée donc instable. Une réaction en chaine (déclencher par tel mécanisme) conduisant à la dégradation des molécules et à leur désintégration en molécules plus petites (**Morelle et esrael, 2003**).

I.2.2.1. Espèces réactives de l'oxygène

L'appellation "espèces réactives de l'oxygène" (ROS) se rapporte aux radicaux libres de l'oxygène (des radicaux primaires et secondaires qui pouvant être retrouvées dans les espaces biologiques) (**Novelli, 1997**).

Tableau 02 : Espèces réactives à l'oxygène primaires et secondaires (**Novelli, 1997**).

ROS primaire	ROS secondaire
Radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)	Des radicaux alkyle (R^{\bullet})
Radical hydroxyle (OH^{\bullet})	Alkoxyle (RO^{\bullet})
Monoxyde d'azote (NO^{\bullet})	Alkyle peroxyde (ROO^{\bullet})

Ces dernières espèces chimiques sont le résultat de l'oxydation de radicaux libres oxygénés « primaire» ($O_2^{\bullet -}$, OH^{\bullet}) sur les principales molécules biochimiques comme les acides gras

polyinsaturés. Ces ROS secondaires sont surtout sélectifs (d'autre part moins réactifs) que les ROS primaire (**Vergely et Rochette, 2003**). On doit noter par ailleurs certains dérivés oxygénés non radicalaires ayant une même degré de toxicité que l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxydinitrite (ONOO^-) (**Novelli, 1997**).

I.2.2.2. Production des radicaux libres

La synthèse des espèces radicalaires est dans les organismes vivants. Ce synthèse peut être morbide et il va généralement de pair avec le métabolisme cellulaire de l'oxygène ainsi que les réactions d'oxydo-réduction (**Lliwell et Gutte, 1989**). On outre, il est susceptible de s'avérer endogène ou exogène.

I.2.2.2.1 Synthèse d'origine endogène

A) La mitochondrie

La mitochondrie est la source majeure d' O_2^\cdot . La production d' O_2^\cdot est reliée à l'intensité d'oxygénation (dans les conditions physiologiques) (addition d'un seul électron, réaction 01). Ainsi, les désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires ou nutritionnels peuvent être des facteurs amplificateurs de cette synthèse (**Sampayo et al., 2003**).

Réaction 01



B) Cellule phagocytaires

Les cellules phagocytaires sont pourvus de la NADPH oxydase, pour voyer quasi exclusivement radical superoxyde (O_2^\cdot). Cette enzyme n'est habituellement activée que lorsque la cellule phagocytaire est elle-même mise en activité forcée. Il en découle une intense consommation d'oxygène qui se décline sous la dénomination universelle : *respirotory burst*. Le superoxyde ainsi synthétisé est responsable du processus de production d'autres particules chimiques réactives à l'image de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite (ClO^-), éléments des structures probablement uniques du matériel phagocyté. Ce mécanisme de synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène est surtout provoqué au cours des diverses infections et serait impliqué dans le stress oxydatif ce qui est évidemment de nature à pouvant compliquer ces processus de désordre pathologique (**Fahen et cohen, 1992**).

C) Les xanthines oxydases/ xanthines déshydrogénases

La xanthine déshydrogénase est une enzyme ubiquitaire qui participe dans le catabolisme de l'ATP. La xanthine oxydase résultant d'une transformation de xanthine déshydrogénase qui elle même engendre du superoxyde en présence d'oxygène ou de xanthine ou d'hypoxanthine, la

conséquence étant la production du peroxyde d'hydrogène et d'autres réactions radicalaires. Il s'ensuit que ce processus de synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène devrait certainement prendre part au stress oxydatif chez surtout les patients victimes d'une pathologie ischémique (**Fahen et cohen, 1992 ; Vergely et Rochette, 2003**).

Réaction 02

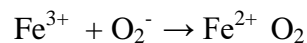


D) Les ions métalliques

Comme le fer et le cuivre, sont connus pour être des précurseurs substantiels de processus radicalaire dans les expériences *in vitro* : ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyl (OH^\bullet) qui est doté d'une force de nuisance plus marquée encore. Ils intensifient tout particulièrement la peroxydation lipidique (**Fahn et cohen, 1992**). Selon **Rabaud et al. (1997)**, le radical hydroxyl (OH^\bullet) est produit à partir de H_2O_2 selon deux réactions non enzymatiques, en présence de forme ionisées de métaux de transition (fer, cuivre)

-La réaction de fenton : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet + \text{Fe}^{3+}$

-La réaction de Fe^{3+} par O_2^- fournit le Fe^{2+} nécessaire à la réaction,



-La réaction d'Haber-weiss : $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$.

I.2.2.2.2. Synthèse d'origines exogènes

Les êtres vivants sont soumis à l'agression de différents agents exogènes capable de donner naissance à des radicaux libres comme Les rayonnement UV, la radiolyse de molécules d'eau (rayons ionisants X ou γ), l'activation des molécules photo sensibilisantes (rayon UV) dont le résultats est la production des anions superoxydes et de l'oxygène singlet (**Favier, 2003**).

Il existe d'autres facteurs externes sont aussi incriminées. Tels que ; la cigarette, les produits chimiques, les pesticides et les poussières d'amiante, la consommation d'alcool, l'effort physique intense (**Morelle et Israel, 2003**).

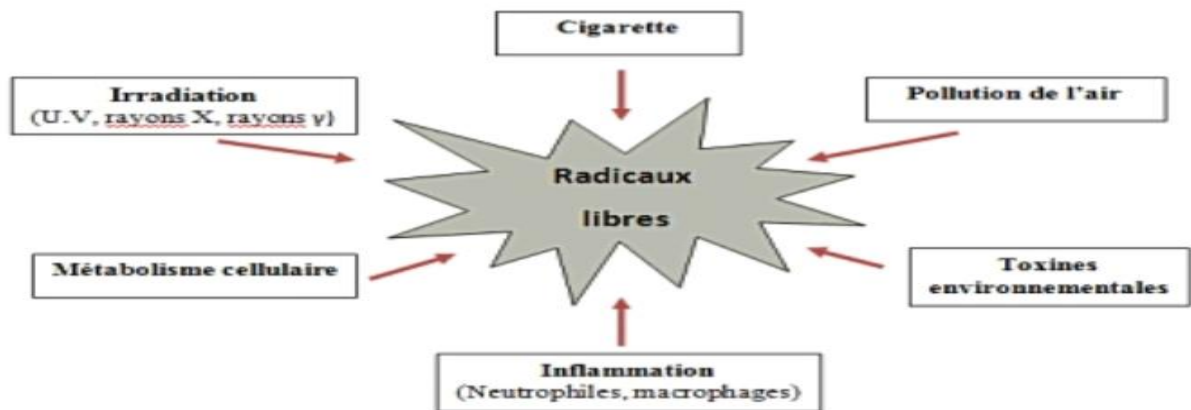


Figure 07 : Résumé des sources exogènes et endogènes des radicaux libres.

I.2.2.3. Conséquences du stress oxydant

Les radicaux libres sont impliqués dans différentes pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (athérosclérose), la cataracte, le cancer, le vieillissement, les maladies inflammatoires (asthme, arthrite rhumatoïde, allergies), et les maladies neurodégénératives telles que Parkinson et Alzheimer (**Issaadi, 2010**).

Le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux libres ce qui explique l'implication de ce stress. Les radicaux libres interviennent dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créent des lésions de l'ADN, amplifient les signaux de prolifération et inhibent les gènes suppresseurs de tumeur. (**Favier, 2003**).

De nombreuses anomalies pathologiques sont également induites par le stress oxydant : malformations des fœtus, dépôts de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression (**Favier, 2006**).

I.2.2.4. Activité antioxydante

I.2.2.4.1. Antioxydants endogènes

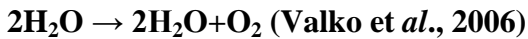
a) Antioxydants endogènes enzymatique

Superoxyde dismutase (*SOD*)

Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (**Garait, 2006**).

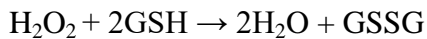
La catalase

On retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Elle catalyse la dismutation de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.



La glutathion peroxydase

Le rôle de la (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (Marfak, 2003). et a un rôle essentiel dans le cycle redox car elle permet le maintien d'un milieu intracellulaire réducteur avec un taux élevé de GSH et un faible taux de GSSG (Daponte, 2013). Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG). (Marfak, 2003).

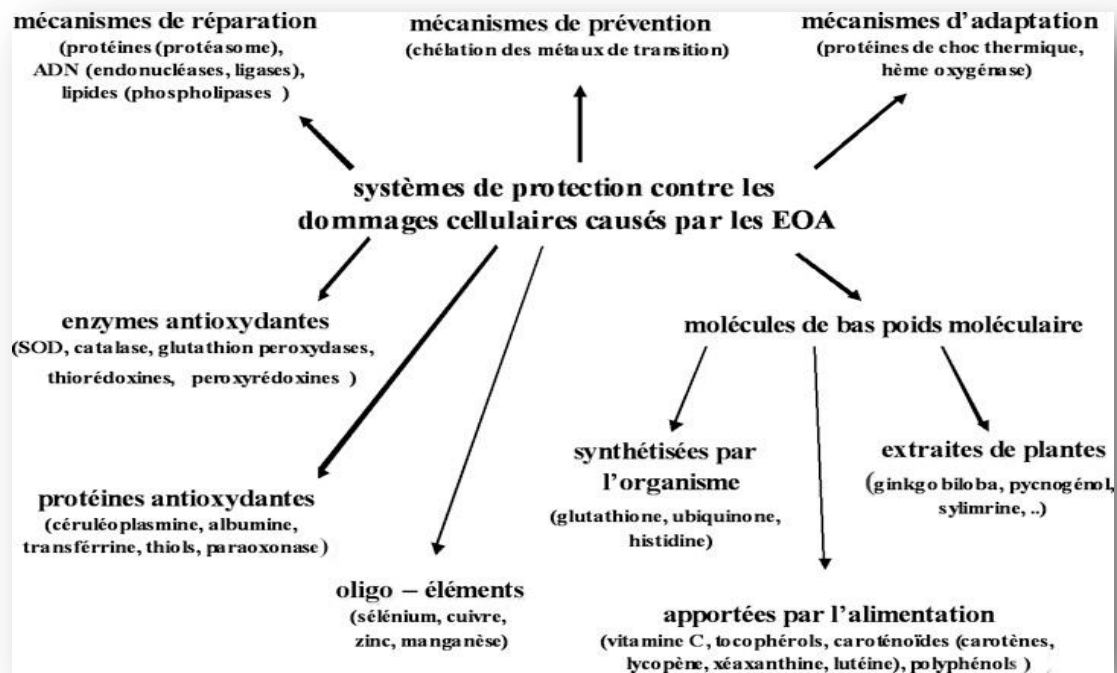


a) Antioxydants non-enzymatiques

Ce type d'antioxydant possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Parmi ces molécules on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine et certaines protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation d'ERO (Pincemail., 2002).

I.2.2.4.2. Antioxydants exogènes

L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogène naturel présent dans son alimentation (**Morelle et Israel, 2003**).dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des EOR, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire. Parmi ceux-ci, on retrouve certaines vitamines : la vitamine E (αtocophérol), la vitamine C (ascorbate), les caroténoïdes (vitamine A et β-carotène, les flavonoïdes...), les polyphénols, les acides gras (oméga-3 et oméga-6) et les oligoéléments (zinc, manganèse et sélénium) et les huiles essentielles (**Koechlin-Ramonatxo,**



2006). Ces substances ne permettent que l'élimination d'un seul radical libre à la fois pour pouvoir fonctionner à nouveau. Les différents antioxydants sont résumés dans la figure 10

Figure 08 : Réseau des antioxydants (Defraigne et Pincemail, 2008)

I.2.2. Mode d'action des antioxydants

Les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres. Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres interrompent la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Berset et Cervelier, 1996**).

I.3. Activités antibactériennes

I.3.1. Définitions

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* des plantes sont nombreuses et donnent par moment des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (**Suhr et Nielsen, 2003**).

Les méthodes les plus utilisées sont la méthode de diffusion et la méthode de dilution. Dans la première méthode les extraits sont déposés sur des disques de papier ou dans des puits creusés. Dans la seconde méthode, les extraits sont incorporés dans le bouillon de culture ou d'autre liquide dans lesquels les bactéries sont présentes. (**Lahlou, 2004 ; Bosio et al., 2000**).

I.3.1. Définitions d'antibactérien

Un antibactérien est une substance qui tue ou inhibe la croissance des micro-organismes comme les bactéries. Sur la base du mode d'action, La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de la substance antibactérienne (**Dorman et Deans, 2000**). Les antibiotiques (des produits microbiens ou leur dérivés, sont capables de tuer les microorganismes sensibles ou empêcher leur croissance) (**Precott et al., 1995**). Leur action étant spécifique et dirigée contre les microorganismes, les antibiotiques peuvent pratiquer leurs actions sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui stoppent la croissance bactérienne sont qualifié de (bactériostatique) alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits (bactéricides).

I.3.2. Origine d'antibiotique

Les antibiotiques sont représentés par des molécules d'origine naturelles et leur dérivés, et aussi d'origine synthétique ou semi synthétique (**Newman et al., 2003 ; Singh et Barrett, 2006**). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes.

I.3.3. Cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques avec leurs diverses classes sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie d'une façon très spécifiques sur certaines structures

de la cellule bactérienne. Les différents mécanismes d'action des antibiotiques sur la cellule bactérienne sont résumés dans la Figure 12.

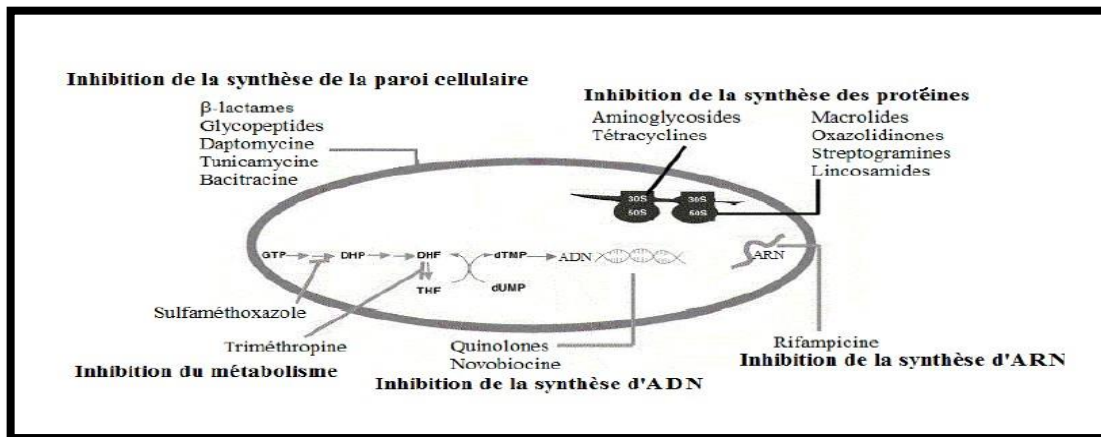


Figure 09 : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

- b) DPH : dihydroptéroate
- c) DHF : dihydrofolate
- d) THF : tétrahydrofolate

I.3.4. Notion du bactériostatique et du bactéricide

Quand l'ATB inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostatique, mais lorsque l'ATB provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide (Haddouchi et al., 1999).

I.3.4.1. Effet bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît. En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées. L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice d'antibiotique pour laquelle il n'a plus des germes microbiens visibles (Muanda, 2010).

I.3.4.2. Effet bactéricide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'ATB utilisées *in vivo* ou *in vitro* ; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après 18 h de culture (Muanda, 2010).

La concentration bactéricide minimale (**CBM**) est la plus faible concentration d'un agent antibactérien nécessaire pour tuer une bactérie particulière. Elle peut être déterminée à partir des tests de concentration minimale inhibitrice (CMI) de dilution en bouillon en repiquant les bactéries sur des plaques d'agar qui ne contiennent pas l'agent antibactérien que l'on teste. La CBM est identifiée en déterminant la concentration la plus faible d'agent antibactérien qui réduit la viabilité de l'inoculum bactérien initial à un niveau supérieur ou égal à 99,9%. La CBM est complémentaire à la CMI ; alors que le test CMI indique le niveau le plus bas d'agent antimicrobien qui inhibe la croissance, le CBM indique le niveau le plus bas d'agent antimicrobien qui entraîne la mort microbienne. Cela signifie que même si une CMI particulière montre une inhibition, le repiquage des bactéries sur de la gélose peut encore entraîner la prolifération de l'organisme car l'antimicrobien n'a pas causé la mort. Les agents antibactériens sont généralement considérés comme bactéricides si la CBM ne dépasse pas quatre fois la CMI. (**Muanda, 2010**)

I.3.5. Résistance microbienne aux antibiotiques (Auto-antibio-résistance)

Elle est définie comme une résistance d'un micro-organisme à un médicament antimicrobien auquel il était précédemment sensible (**Alwash et al., 2013**). Cette résistance provient de l'utilisation intensive d'antibiotiques à des fins humaines, vétérinaire et agricole, causant leur libération continue dans l'environnement et l'évolution des gènes résistants (**Rizzo et al., 2013; Sahu et al., 2012**), les maladies d'immunosuppression peuvent causer aussi le développement de cette résistance (**Sivananthan, 2013**).

Les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques à travers plusieurs mécanismes, notamment, la modification ou l'élimination des sites de liaison des agents antibactériens, la régulation de la production des enzymes qui peuvent désactiver l'agent antimicrobien, le réglage ou la modification des canaux membranaires par lesquelles l'antibiotique traverse les cellules (**Tenover, 2006**), le changement de la perméabilité cellulaire et le transfert horizontal de gènes de résistance (**Rodríguez-Rojas et al., 2013**).

I.4. Activités antifongiques

Définitions

Les antifongiques sont des substances (naturelles) capables de détruire sélectivement ou non les différents champignons rencontrés en mycologie. Ils s'administrent par voie locale ou générale (**O'fel, 1982**). L'activité antifongique est également dépendante de la concentration des éléments fongiques, du temps de contact avec l'antifongique, du pH du milieu et de la température ambiante. Une échelle de mesure de l'activité antimicrobienne (des antibiotiques) a été mise par **Meena et Sethi (1994)**, répartissant les diamètres des zones d'inhibition en 04 classes :

- Fortement inhibitrice: lorsque le diamètre de zone d'inhibition ≥ 28 mm.
- Modérément inhibitrice: le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16 mm et 28 mm.
- Légèrement inhibitrice: le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 10 mm et 16 mm.
- Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est < 10 mm.

I.4.1. Classes de composés et leurs activités antifongiques

I.4.1.1. Terpénoïdes

Terpénoïdes (ou isoprénoïdes), une sous-classe des prényllipides (terpènes, nones et sterols), représentent le groupe le plus ancien par les plantes et sont probablement le groupe le plus répandu de produits naturels. Il a été rapporté dans la littérature que les aglycones de terpénoïdes sont plus stables et actifs par rapport aux glycosides. Par exemple quatre iridiods non glycosidiques ont été découverts chez *Aliertial macrophylla* et deux des hydroxydes 1a et 1b drocornine aglycones a montré une fongitoxicité contre une gamme de *Clostridium* et espèces d'*Aspergillus* (**Young et al., 1992**).

I.4.1.2. Saponines

Une source importante d'antifongiques constitutifs est les saponines. Les saponines sont naturelles, les détergents qui sont des agents anticancéreux efficaces antimicrobiens et hypocholestérolémiantes livres sterling. Ces composés chimiquement liés au groupe triterpénoïde tels que les saponines triterpéniques, ainsi que les saponines stéroïdiennes, ont également été isolées en tant que constituants antifun-gal. (**Nagata et al., 1985**).

I.4.1.3. Composés phénoliques

Ces dernières années, un grand nombre d'études ont été publiées sur l'activité antimicrobienne des composés phénoliques d'origine naturelle. Dans de nombreux cas, ces substances servent de mécanismes de défense contre les micro-organismes et les insectes, etc. Certaines plantes donnent leurs odeurs comme les terpénoïdes, mais d'autres (quinones et tanins) sont responsables des pigments végétaux. Un grand nombre de plantes aromatiques montrent une activité antibactérienne et souvent antifongique. Ces composés comprennent les phénols simples et alkylés, l'acide phénolique, les phénylpropanoïdes, les coumarines, les quinines, les anthraquinones et les xanthones, etc. ont été rapportés avec d'autres acides phénoliques comme constituants antifongiques constitutifs (**Tahara et al., 1984**).

I.4.1.4. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés chimiques naturels contenant des atomes d'azote basiques. Il existe de nombreux rapports sur les alcaloïdes présentant une activité contre les pathogènes, par exemple, l'alcaloïde isoquinoléine jatrorrhizine, une gamme de peptidealkaloïdes, la quinolizidine alcaloïde dietamnine et les alcaloïdes pyrrolizidine, etc., (**Harborne et Baxter, 1993**).

I.4.1.5. Protéines et peptides

La défensine a été isolée de la légumineuse *Trigonella foenum-graecum*, la protéine est caractérisée par la présence de huit résidus de cystéine, conservés les différentes défensines végétales et formant quatre ponts disulfures qui stabilisent le Peptide mature. La protéine a présenté une activité antifongique contre l'hôte large Champignon de l'aire de répartition, *R. solani* et le champignon de la tache de la feuille d'arachide, *Phaeoisariopsis personata* (**Olli et Kirti, 2006**).

I.4.2 Mécanismes d'action antifongiques

I.4.2.1. Inhibition de la formation de paroi cellulaire

La paroi cellulaire fongique est principalement constituée de β -glucanes. Si la synthèse de ces composés est inhibée, l'intégrité de la paroi cellulaire va se perturber (**Walker et White, 2011 ; Mc Clanahan, 2009**).

I.4.2.3 Rupture de la membrane cellulaire

Les ergostérols sont essentiels pour la membrane cellulaire. Si ces stérols sont liés par des médicaments antifongiques, ou si leur synthèse est inhibée par des inhibiteurs de la biosynthèse de

l'ergostérol, l'intégrité de la membrane cellulaire va se rompre. La membrane devient alors étanche (Walker et White, 2011 ; Mc Clanahan, 2009).

I.4.2.3. Dysfonctionnement de la mitochondrie fongique

L'inhibition du transport d'électrons mitochondrial entraînera une réduction du potentiel membranaire mitochondrial. L'inhibition peut se produire via l'inhibition des pompes à protons dans la chaîne respiratoire, entraînant une réduction de la production d'ATP et la mort cellulaire subséquente (Walker et White, 2011 ; Kim et al., 2013).

I.4.2.4. Inhibition de la division cellulaire

L'inhibition de la division cellulaire peut se produire par l'inhibition de la polymérisation des microtubules, inhibant ainsi la formation du fuseau mitotique (Walker et White, 2011 ; Mc Clanahan, 2009).

I.4.2.5. Inhibition de la synthèse ARN / ADN ou synthèse protéique

Si l'agent antifongique pénètre dans la cellule, par exemple via un transport actif sur des ATPases, et interfère avec l'ARN, il peut provoquer une synthèse d'ARN défectueuse et une inhibition de la transcription de l'ADN. L'inhibition de la synthèse des protéines est également une cible antifongique connue (Clanahan, 2009).

I.4.2.6. Inhibition des pompes d'efflux

Les pompes à efflux sont présentes dans toutes les cellules vivantes et leur fonction est de transporter des substances toxiques hors de la cellule (Kang et al., 2010). Ce transport inclut souvent le transport du médicament accumulé hors de la cellule fongique. La surexpression des pompes d'efflux peut conduire à une pharmacorésistance. En inhibant les pompes d'efflux, on pense que la résistance aux médicaments peut être réduite (Kang et al., 2010).

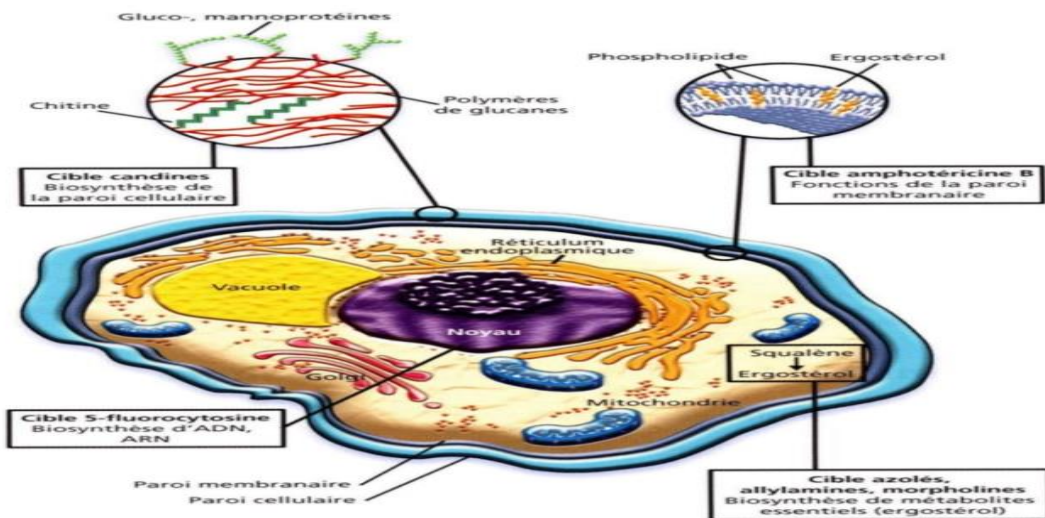


Figure 10 : Cibles des différents antifongiques

I.4.3. Evaluation de l'activité antifongique

Plusieurs paramètres sont utilisés dans la bibliographie pour évaluer l'activité antifongique. Parmi ces paramètres, on peut citer :

I.4.3.1 Détermination l'indice antifongique

L'indice antifongique est déterminé après l'incubation pendant 144 h en tenant compte de la croissance de témoin. On calcule l'indice antifongique par la formule suivante (Chang et al., 1999) :

$$IA = (1 - Da/Db) \times 100$$

Da: diamètre de la zone de croissance de l'essai.

Db: diamètre de la zone de croissance du témoin.

I.4.3.2. Détermination des concentrations minimale inhibitrices (CMI)

Il s'agit d'évaluer la plus petite concentration pour laquelle aucun développement de champignons n'est visible à l'œil nu.

I.4.3.3. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VCM)

La vitesse de la croissance mycélienne (VCM) de chaque concentration peut être déterminée par la formule suivante :

$$VCM = [D_1/Te_1] + [(D_2 - D_1)/Te_2] + [(D_3 - D_2)/Te_3] + \dots + [(D_n - D_{n-1})/Te_n]$$

D: diamètre de la zone de croissance du

D Di: diamètre de la zone de croissance chaque jour (i).

Te: temps d'incubation.

I.5. Composition et activités biologiques de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade

L'écorce de grenade contient plusieurs constituants appelés les polyphénols tels que :

- Acides phénoliques.
- Acides cinnamiques.
- Flavonoïdes :
 - Flavonols.
 - Anthocyanes.
 - Tanins.

I.5.1. Compositions de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (**Salunkhe, 1990**). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**Salunkhe, 1990**).

I.5.1.1. Acides phénolique

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (**Psova et al., 2003**). Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont principalement présents dans la grenade par la présence de l'acide gallique et l'acide ellagique (**Amakura et al., 2000**).

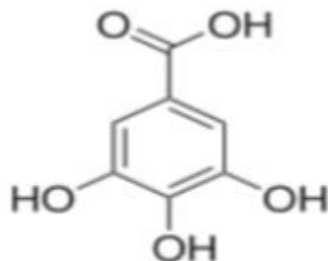


Figure 11 : Acide gallique.

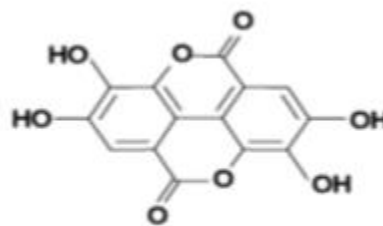


Figure 12 : Acide ellagique.

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (**Guignard, 1996**), et les dérivés de l'acide cinnamique (**Malagas, 1992**).

La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents (**Fleuriet et al., 2005**). Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides phydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques ont des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, il est rencontré dans la nature surtout sous forme de dimère (**Ribereau-Gayon, 1968**).

Les acides cinnamiques possèdent une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide o-coumarique, l'acide caféique et l'acide cinnamique (**Ribereau-Gayon, 1968**). Les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxylés, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide o-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent respectivement aux acides p-coumarique, caféique et férulique. Signalons également la fraxétine et la daphnétine (**Dean, 1963**).

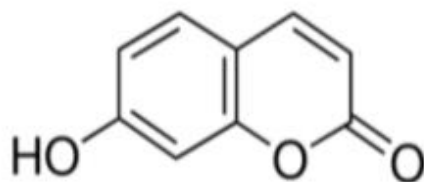


Figure 13 : Umbelliférone

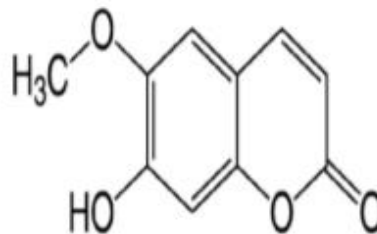


Figure 14 : Scopolétine

La teneur en polyphénols totaux d'extrait méthanolique des grenade varie entre 80 mg (**Benbrahim, 2017**) à 412.5 mg EAG/g (**Viuda-Mators et al., 2010**).

I.5.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin flavus : jaune) sont des substances généralement colorées répandues chez les végétaux ; elles sont trouvées dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (**Guignard, 1996**). Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la

chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaines), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire (**Gabor, 1988**). Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (**Bruneton, 1999**).

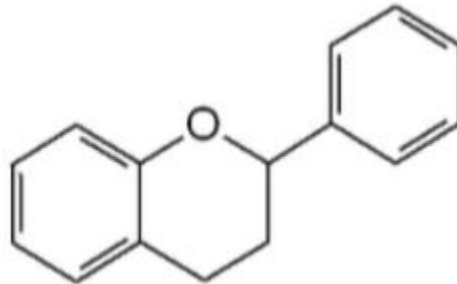


Figure 15 : Squelette de base des flavonoïdes

Squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides phydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques ont des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, il est rencontré dans la nature surtout sous forme de dimère (**Ribereau-Gayon, 1968**). Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graine et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus, comme par exemple les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuance jaune et orangée). De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical pour leurs activités antivirales, anti tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anticancéreuses (**Meddleton et Kardasnam, 1993**). La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (**Medic-Sanic et al., 2004**). Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure des flavonoïdes, il convient de citer notamment:

Dans la littérature, la teneur en flavonoïdes totaux d'extrait méthanolique des grenade varie entre 32.24 mg EAG/g (**Elamimi, 2017**).à 60 mg EAG/g (**Safi et Benbrahim, 2016**)

A. Flavonols

Les flavonols (hydroxy-3 flavone) sont largement répandus et incolores, ils sont caractérisés par la présence d'un carbonyle en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Les

flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs en jaune primevère (**Guignard, 1996**).

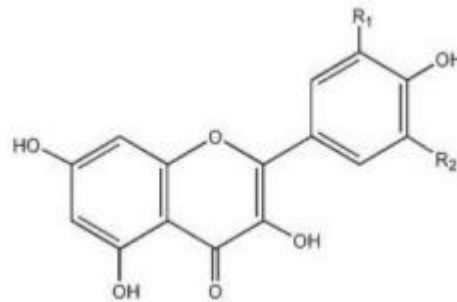


Figure 16 : squelette de Flavonols.

B. Anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et Kuanos, bleu violet) est un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés (**Guignard, 1996**). Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capable d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (**Brouillard, 1986**).

Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu, elles donnent de la couleur aux fleurs et aux fruits, et elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau (**Harbone et Grayer, 1988**). Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, nous trouvons également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle. Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3 (**Ribereau Gayon, 1968**). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule, L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.

I.5.1.3. Tanins

Les tanins sont des poly phénols que nous trouvons dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, grenade, datte, café, cacao,..). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**). Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tanins hydrolysables, esters des acides-phénols et de glucose.

La teneur en flavonoïdes totaux d'extrait méthanolique des grenade varie entre 122 mg EAG/g (**Safi et Benbrahim, 2017**).à extraits méthanoliques condensés de 47.78 mg EAG/g et Teneur en tanins hydrolysables 214.28 mg EAG/g (**Douaouri, 2017**).

I.5.3. Rôle et intérêt des composés phénoliques

- **Chez les végétaux**

Les polyphénols ont un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance.

- Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets (**Makoi et Ndakidemi, 2007**).
- Ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs.
- Représentent un système de défense contre les microorganismes pathogènes.
- Interviennent dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (**Stalikas, 2007**).
- Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexine permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries chez les plantes (**Makoi et Ndakidemi, 2007**).

- **Chez les humains**

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Fleuriet et al., 2005**).

Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) et 2.2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine. Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999**).

I.5.4. Activités biologique de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade

I.5.4.1. Activités antioxydantes

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants (**Laughton et al., 1989**) qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyles des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote, enfin de réaction, le cycle de

génération de nouveaux radicaux est interrompu Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ionique s'implique dans la production de radicaux libres Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des prooxydants (**Spiller, 2007**).

I.5.3.2. Activités antimicrobiennes

Les plantes possèdent un système de défense contre les herbivores, les insectes et les microorganismes. Ce système de défense est dû à la synthèse des substances aromatiques et composés phénoliques **Selon Packer (1979)**. Les tanins sont doués d'activité antibactérienne et antifongique comme le montrent les travaux de plusieurs chercheurs les tanins présentent une forte activité antifongique sur *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (**Selon Kolodzie et al., 1999**).

Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes ont une activité antifongique à cause de la capacité d'inhibition de la germination des spores des espèces pathogènes des plantes, les flavonoïdes ont été proposés pour usage contre les infections fongiques de l'Homme. En effet, l'activité des composés 5, 7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butenyl])-(2S)flavanone et le 7-hydroxy-3',4'-(méthylendioxy) flavan contre l'espèce pathogène opportuniste *Candida Albicans*, Ainsi que le 6, 7,4'-trihydroxy-3',5'-diméthoxyflavone et le 5,5'- dihydroxy-8,2',4'-triméthoxy flavone, en association avec le 5,7,4'- trihydroxy-3',5'diméthoxyflavone contre *Aspergillus flavus* a été démontrée. En plus, le galangin (flavonole) montre une activité inhibitrice contre *Aspergillus ta marii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum*.

Une étude sur l'effet bactéricide de différents flavanones sur l'espèce *Staphylococcus aureus* a montré que c'est l'ADN gyrase qui a été inhibée (**Milane, 2004**).

- **Mécanisme d'action antimicrobien de certains polyphénols**

Les mécanismes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols sont illustrés dans le tableau 03.

Tableau 03: modes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols (**Packer, 1979**).

Différents composés phénoliques	Exemples	Mécanisme
Phénols simples	Catéchol Epicatechine	La privation de Substrat. L'interruption de la fonction membranaire.
Acides Phénoliques Quinones	Acide Cinnamique Hypericin Chrysin	Destruction de la paroi cellulaire et désactivation des enzymes
Flavonoïdes Flavones Tannis	 Abyssinone Ellagitannin	Inhibition de la transcriptase reverse du HIV. Liaison aux protéines. Inhibition des enzymes. Privation de substrat. Complexe avec la paroi cellulaire. Interruption de la fonction membranaire. Complexe avec lésions métalliques
Coumarines	Warfarin	Interaction avec l'ADN des eucaryotes. (activité antivirale)

I.5.3.3. Activité antifatique

L'effet des polyphénols extraits à partir de la peau de grenade (EPG) a été étudié sur la performance de natation chez le rat. Dans la présente étude, la propriété antifatique de l'EPG a été clairement établie pour la première fois; grâce à des activités enzymatiques réduites du lactate déshydrogénase (LDH), la créatine pyruvate kinase (CPK) et de la peroxydation lipidique, l'augmentation de la production d'ATP avec un contenu en glycogène meilleur dans le foie et le muscle a appuyé les conclusions. Les niveaux accrus de la teneur en ADN et en ARN dans les tissus indiquant un catabolisme réduit des protéines dans les tissus aussi contribuent à la propriété antifatique des polyphénols de l'EPG (**Swamy et al., 2011**).

I.5.3.4. Activité antidiabétique

Une étude visant à évaluer le rôle de l'extrait de la poudre de peaux de *Punica granatum* dans sa dose thérapeutique humaine sur le nombre des cellules bêta, la glycémie et les taux plasmatiques

d'insuline chez des rats normaux et des rats diabétiques alloxanes pendant 4 semaines de traitement. Le traitement a révélé que l'extrait aqueux de grenade a diminué significativement le niveau de glucose du sang et augmenté le niveau d'insuline dans les rats normaux et les rats diabétiques traités. Le pancréas a montré une augmentation du nombre des cellules bêta dans les rats normaux et les rats diabétiques traités (**Khalil, 2004**).

Dans une autre étude (**Labib Ahmed Hossin, 2009**) qui a été réalisée pour évaluer l'effet de la poudre de peau de grenade et son extrait sur le métabolisme des lipides chez les rats males hypercholestérolémiques, la poudre de la peau de grenade a été ajoutée à un régime hypercholestérolémique par 5, 10 ou 15% comme fibre diététique tandis que l'extrait de la peau de grenade a été ajouté à un régime hypercholestérolémique par 1, 2 ou 3%. Les résultats ont montré que les rats hypercholestérolémiques ont subi des changements très importants dans tous les paramètres lipidiques testés en comparaison avec le groupe témoin négatif (rats normaux).

Tous les rats hypercholestérolémiques administrés avec différentes doses de la poudre de la peau de grenade (5, 10 et 15%) ont montré une diminution significative de la consommation alimentaire et du taux de gain de poids corporel en comparaison avec le groupe témoin positif (rats hypercholestérolémiques) (**Labib, 2009**).

Le poids des organes rate, reins, foie par rapport au poids corporel et tous les paramètres lipidiques testés, sauf HDL ont montré une diminution hautement significative pour tous les rats hypercholestérolémiques administrés avec différentes doses de poudre de peau de grenade (5, 10 et 15%) ou administrés avec différents niveaux d'extrait de peau de grenade (1, 2 et 3%) en comparaison au groupe témoin positif (**Labib, 2009**).

I.5.3.5. Activité cicatrisante

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

I.5.3.6. Activité anticancéreuse

Les cellules cancéreuses ont la capacité de redevenir des cellules saines par un processus appelé différenciation. Les flavonoïdes peuvent induire cette différenciation avec une toxicité plus

faible que les rétinoïdes, ce qui les rend intéressant pour le traitement de la leucémie, mais aussi des cancers du sein ou de la prostate. Ainsi, les fractions riches en polyphénols de grenade ont une activité antiproliférative, anti-invasive, anti-eicosanoïde, anti-angiogène et proapoptose sur des cellules cancéreuses de sein et de prostate. Une étude réalisée sur des promyélocytes humains de leucémie (HL-60) montre que des extraits riches en flavonoïdes, obtenus l'un à partir de jus de grenade fermenté et l'autre à partir de péricarpe de grenade, sont fortement promoteurs de différenciation, alors que l'extrait de jus de grenade frais a un effet plutôt faible. Les extraits de grenade ont aussi une action inhibitrice de la prolifération des cellules cancéreuses, les extraits de jus fermenté et de peau de grenade étant plus efficaces (**Kawaii et Lansky, 2004**).

II. Méthode d'analyse

Le travail de recherche accompli dans la présente étude a été effectué au niveau du laboratoire de Biochimie appartenant au département Biologie Appliquée et au niveau du laboratoire pédagogique du département des Sciences de la Terre et de l'Univers. Une partie des travaux a été accomplie dans le Laboratoire de recherche sur les Molécules Bioactives et Applications.

II.1. Matériel végétal

La collecte du fruit de *Punica granatum* a été effectuée dans la région de Tébessa au cours du mois d'octobre 2019. Les écorces ont été séchées à l'air libre et à température ambiante puis broyées grâce à un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre fine (Figure 17) nécessaire à la préparation de l'extrait.

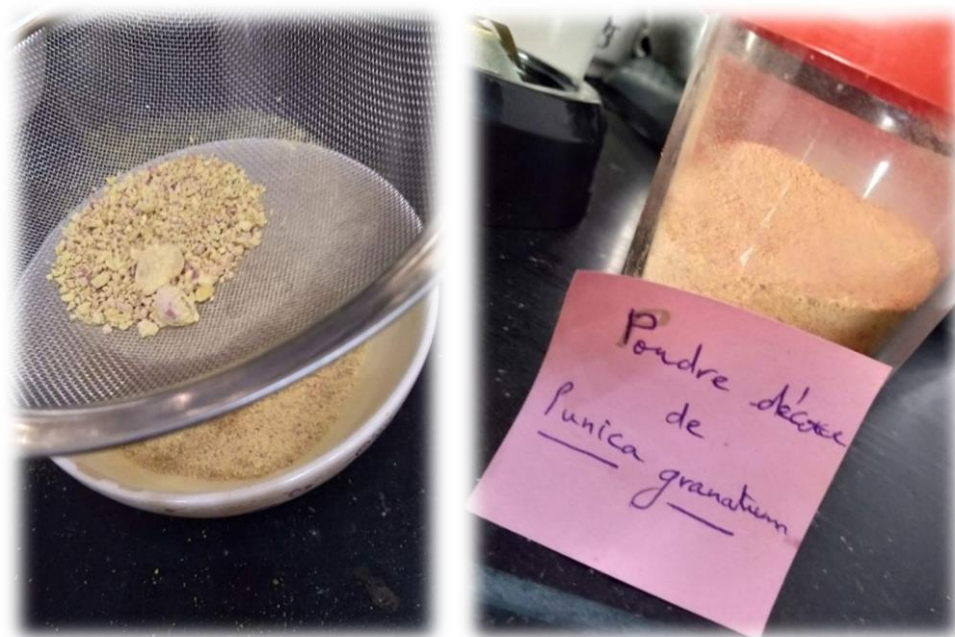


Figure 17 : Poudre d'écorce de *Punica granatum*.

II.1.1. Matériel d'extraction

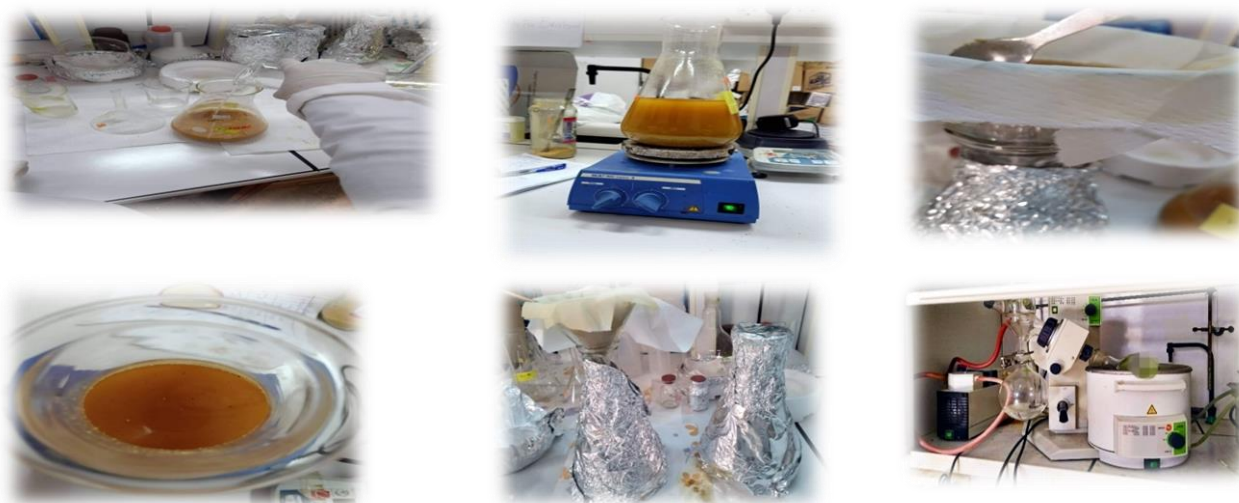
Le Tableau ci-dessous représente les différents matériels et les instruments utilisés pour la procédure d'extraction.

Tableau 04 : Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction.

Appareil	Verreries et Autres	Solvant et Soluté
Balance (Scout Pro)	Eprouvette de 500 ml	Eau distillé
Hydro-distillateur de type Clevenger : <ul style="list-style-type: none"> • Chauffe-ballon • Ballon en verre pyrex 2000 ml • Une colonne • Un réfrigérant • Un collecteur 	Flacon en verre du 5 ml	Acétone
	Pissette	
	Entonnoir	
	Bécher de 50 ml	
	Papier aluminium	

II.1.2. Procédé d'extraction

Cent grammes (100 g) de poudre a été macéré dans 1000ml du méthanol pendant 72h à température ambiante, la macération a été répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. L'extrait a été récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre, le méthanol est éliminé du filtre par évaporation rotative dans un rotavapor (BÜCHI). L'extrait a été conservé pour l'utilisation ultérieure. (Figure 18).



Figures 18 : Procédure d'extraction.

II.1.3. Calcul du rendement d'extrait

Le rendement en extrait a été déterminé par le rapport entre la masse d'extrait obtenue et celles de la matière sèche utilisée selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse d'extrait (g)}}{\text{Masse de la matière végétale utilisée (g)}} \times 100$$

R : Rendement en extrait d'épicarpes

II.3. Evaluation de l'activité biologique

II.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité anti-radicalaire d'extraits de grenade a été évaluée dans ce travail en adoptant deux types de tests in vitro. Il s'agit de la méthode de piégeage du radical DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle) et le test de réduction du fer (FRAP : ferric reducing antioxidant power).

II.3.1.1. Test d'activité anti DPPH

• Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams et al. 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. L'efficacité d'un antioxydant est proportionnelle à la réduction de la coloration bleue, (figure 19) due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.

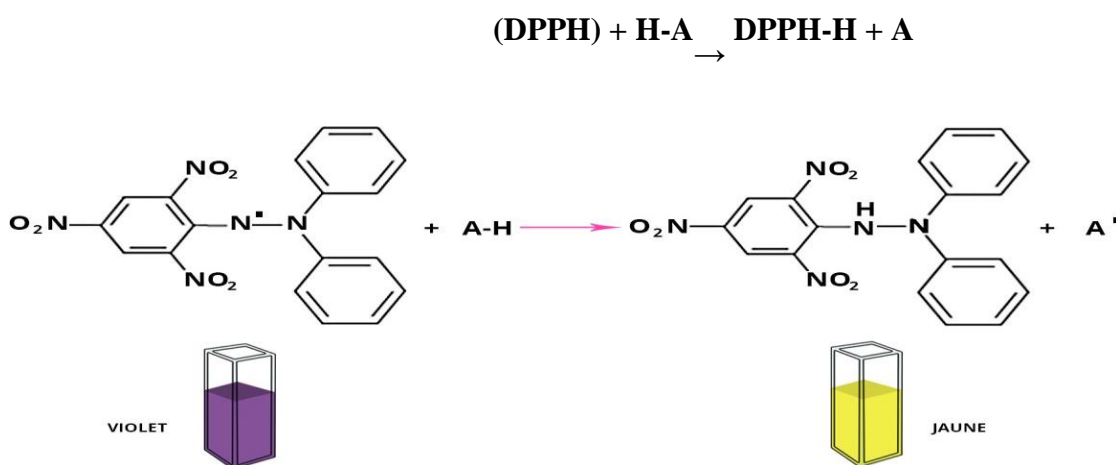


Figure 19: Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Amié, 2003)

DPPH : 2.2 diphenyle- 1- picryl-hydrazyl

AH : un composé capable de céder un H au radical DPPH

A : le composé oxydé après la réduction de DPPH

II.3.1.1.1. Matériel et réactif

Les différents matériels et les réactifs utilisés sont résumés dans le Tableau 05.

Tableau 05: Liste d'appareils et réactifs utilisés pour l'activité anti-DPPH.

Appareil	Verrerie et Autres	Réactifs	Solvant et Solutés
Spectrophotométrie UV-VISIBLE 1700 (Pharma Spec SHIMADZU)	Eprouvettes graduées de 25 ml	Acide ascorbique	Méthanol
	Spatule		Eau distillé
	Fiole jaugée 50ml et 100ml		
Micropipettes : 100ul-1000ul 10ul-100ul	Bécher de 50 ml	le DPPH (2,2 diphényl-1-picryl hydrazyl)	
	Verre de montre		
Balance de précision (ALS286 4N)	Tube à hémolyse de 05 ml avec un portoir	Extrait de grenade	
	Les embouts jaunes et bleus		
	Entonnoir		
	Papier aluminium		

II.3.1.1.2. Mode opératoire

Selon la méthode décrite par **Burits et Bucar (2000)**, 25µl de chacune des solutions méthanolique d'extrait testée à différentes concentrations (200µg/ml, 400µg/ml, 600µg/ml, 800 µg/ml et 1000µg/ml) sont mélangées avec 2,5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%) qui est préparée par la solubilisation de 0,004g de DPPH poudre dans 100ml de Méthanol.

II.3.1.1.3. Détermination de pourcentage d'inhibition

Selon **Shariffar et al. (2007)**, l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) a été calculée de la manière suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{DO contrôle} - \text{DO d'échantillon}}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

II.3.1.1.4. Détermination de l'IC50

La cinétique des réactions des extraits et de l'acide ascorbique avec le DPPH a été inscrite à chaque concentration examinée. A la fin des réactions, les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations en extrait méthanolique et en acide ascorbique ont été tracés pour obtenir à l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise

pour réduire 50% de la concentration initiale de DPPH (Khoudali et al., 2014). La CI50 a été déterminée graphiquement en utilisant la formule issue de la régression linéaire.

II.3.1.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

• Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Oyaiz, 1986 ; Bougandoura, 2013).

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (PRIOR et al., 2005). (Figure 20).

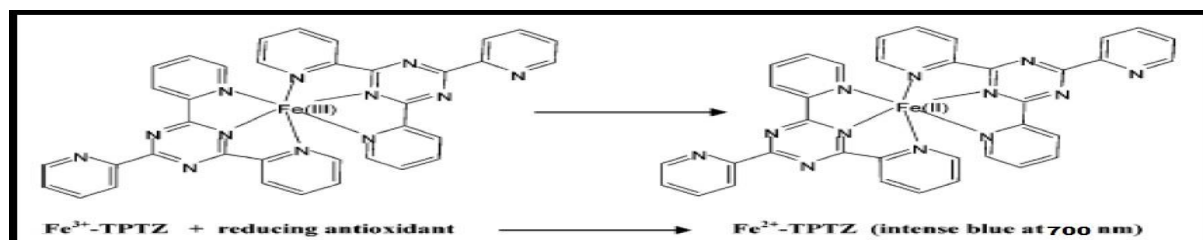


Figure 20 : La réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (PRIOR et al, 2005)

TPTZ: ferric2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine.

Fe^{2+} : Ions ferreux.

Fe^{3+} : Ions ferriques (PRIOR et al. 2005).

L'augmentation de l'absorbance en fonction de la concentration d'extrait indique une augmentation de la capacité réductrice. La capacité de réduction d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité antioxydant (Gunda et al., 2013).

II.3.1.2.1. Matériel et réactif

Le Tableau 06 a présenté les différents matériels et réactifs qui été utilisé.

Tableau 06 : Liste d'appareils et réactifs utilisé dans le test du FRAP

Appareil	Verrerie et Autres	Réactifs	Solvant et Solutes
Spectrophotométrie UV-VISIBLE 1700 (Pharma Spec SHIMADZU)	Eprouvette 10 ml	Tampon phosphate de PH 6,6 : H ₃ PO ₄ et NAOH	Methanol
	Fiole jaugée 50ml-100ml-250ml		Eau distiller
Micropipettes : 100ul-1000ul 10ul-100ul	Bécher de 50 ml	Ferricyanure de potassium [K ₃ Fe(CN) ₆] à 1%	
	Verre de montre		
Balance de précision (ALS286 4N)	Tube à hémolyse de 05 ml avec un portoir	Acide trichloracétique à 10%	
Centrifugeuse	Les embouts bleus et jaunes	Chlorure ferrique [Fe cl ₃ (H ₂ O) ₆] à 0.1%	
Bain-marie	Papier aluminium	Acide Ascorbique	
		Extrait methalonique de grenade	

II.3.1.2.2. Mode d'opérateur

Le protocole expérimental déterminé est celui d'Oyaizu, (1986) où 0,5 ml de extrait à différentes concentrations (200µg/ml, 400µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml et 1000µg/ml) dilué dans méthanol est mélangé avec 1,25 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe (CN)₆ à 1 %, puis incubation des tubes au bain-marie à 50°C pendant 20min, laisser les refroidisses. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10 % est ajouté pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tours pendant dix minutes. Finalement 1,25 ml du surnageant est combinée avec 1,25 ml d'eau distillée et 250 µl d'une solution de chlorure de fer (FeCl₃, 6H₂O) à 0,1 % fraîchement préparée.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc semblablement préparé à 700nm par un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions. La cinétique de la réaction a été déterminé à différents temps (0, 5, 10, 15, 20, 25, et 30 min). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi, 1965). Tous les essais ont été effectués en double.

II.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

II.3.2.1. Matériel

Le Tableau ci-dessus a présenté les différents matériels et réactifs.

Tableau 07 : Matériels de l'activité antibactérienne

Appareil	Verreries et Autres	Réactifs et Autres	Solvants et Solutés
Balance de précision (ALS 286 4N)	Tube à vis 16×160 mm et portoir	Milieu solide MH	Eau physiologique stérile
Micropipette de 10-100µl	Erlenmeyer 1000ml	Gélose nutritive	Eau distillée
Plaque chauffante/agitateur magnétique (IKA RH basic 2)	Deux flacons de 200 ml	Extrait méthanolique de grenade (1000µg/ml)	Eau de javel
	Spatule		
Etuve (DLAB TECH DAI HAN co LTD)	Anse platine		
	Pipette pasteur		
Etuve (Heraeus typ 5042)	Ecouvillon		
Autoclavage	Boîtes pétri		
Bec benzène	Disques stériles/Pince		
	Embouts jaunes		
	Papier aluminium		

Pour évaluer l'activité antibactérienne, d'extrait nous avons adopté la méthode d'aromatogramme c'est une méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles de papier WATTMAN.

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérienne en gélose, avec une concentration standard pendant un certain temps de contact entre le produit et les bactéries cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (**Meddour et al., 2013**).

II.3.2.2. Milieu de culture

Nous avons utilisé la gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries respectivement aux différents extraits d'écorces de grenades. La préparation de ce dernier se fait comme suite :

- Peser avec précision une quantité de poudre déshydratée du MH équivalente 15,2g dans un Erlenmeyer, en y ajoutant 400 ml d'eau distillée.
- Le mélange de poudre-eau distillée est chauffé sur plaque chauffante avec agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 20 min afin d'assurer une bonne dissolution des cristaux.
- Le milieu préparé est ensuite réparti dans deux flacons stériles avant d'être Autoclavé pendant 20 min à 120°C.

II.3.2.3. Protocole expérimental

Trois, souches bactériennes ont été choisies qui sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micococcus* (Tableau 08). Ces souches ont été procurées au près du laboratoire de microbiologie de du département de Biologie Appliquée. Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant 5 ml d'eau physiologique. Le contenu des tubes a été homogénéisé grâce à une faible agitation manuelle.

Tableau 08 : Souches bactériennes utilisées.

Bactéries	Souches	Référence
Gram positive	- <i>Staphylococcus aureus</i>	- ATCC25293
Gram negative	- <i>Micococcus Luteus</i>	- DSM1790
	- <i>E. coli</i>	- ATCC25922

- Préparation des boites : la gélose MH stérile bouillie dans le bain-marie pendant environ 1h du temps, après, la gélose coulé dans des boites de pétries dans un zone stérile par le Bec benzène puis laissées 1 heure pour la solidification (Figure 21).
- Préparation des disques : des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre sont préparés par un appareil spécial puis stérilisé et les puits sont creusés dans la gélose grâce à une pince stérile.
- Repiquage des bactéries jeunes (Figure 21).
- Dépôt de 0,15 µl d'extrait de grenade sur chaque disque à parti d'une solution mère de 1000µg/ml. Cette opération est réalisée en triple répétition auprès de bec benzène.

- Incubation pendant 24 à 48 h dans une étuve réglée préalablement à une température 37 °C pour *E.coli* et *Mico* et *S.aureus* 30°C.

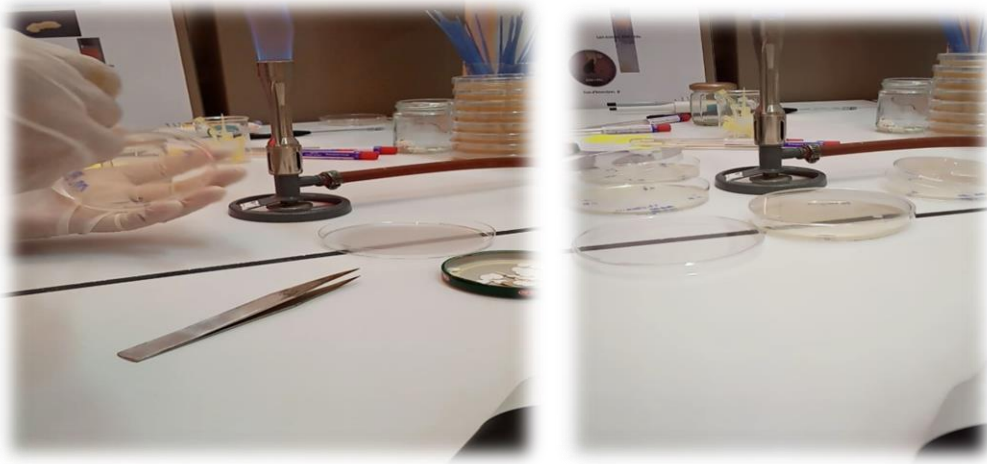


Figure 21 : Préparation des boîtes de pétri et de repiquage des bactéries jeunes
(photos personnelle)

II.3.2.4. Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de zone d'inhibition qui a apparu autour les disques à l'aide d'une règle.

- Présence de zone claire autour du disque : présence d'activité inhibitrice.
- Absence zone claire autour du disque : Absence d'activité inhibitrice.

II.3.3. Evaluation de l'activité antifongique

II.3.3.1. Matériel

Les différents matériels et les réactifs utilisés sont résumés dans le Tableau 09

Tableau 09 : Matériels de l'activité antifongique

Appareil	Verreries et Autres	Réactifs et Autres	Solvants et Solutés
Balance de précision (ALS 286 4N)	Tube à vis 16×160 mm et portoir	Milieu solide sabouraud	Eau physiologique stérile
Micropipette de 10-100µl	Erlenmeyer 1000ml	Sabouraud nutritive	Eau distillée
Plaque chauffante/agitateur magnétique (IKA RH basic 2)	Deux flacons de 200 ml	Extrait méthanolique de grenade (1000µg/ml)	Eau de javel
	Spatule		
Etuve (DLAB TECH DAI HAN co LTD)	Anse platine		
	Pipette pasteur		
Etuve (Heraeus typ 5042)	Ecouvillon		
Autoclavage	Boîtes pétri		
Bec benzène	Disques stériles/Pince		
	Embouts jaunes		
	Papier aluminium		

Pour évaluer l'activité antifongique, d'extrait nous avons adopté la méthode d'antibiogramme c'est une méthode de diffusion sur milieu sabouraud en utilisant des disques stériles de papier WATTMAN.

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antifongique en gélose, avec une concentration standard pendant un certain temps de contact entre le produit et les bactéries cible. L'effet du produit antifongique sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

II.3.3.2. Milieu de culture

Nous avons utilisé le milieu de Sabouraud pour l'étude de la sensibilité des levures à extrait méthanolique de grenade. La préparation de ce dernier se fait comme suit :

- Peser avec précision une quantité de poudre déshydratée du SB équivalente 36,6 g Sabouraud en poudre en Erlenmeyer, en y ajoutant 600 ml d'eau distillée.
- Le mélange de poudre-eau distillée est chauffé sur plaque chauffante avec agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 20 min afin d'assurer une bonne dissolution des cristaux.
- Le milieu préparé est ensuite réparti dans deux flacons stériles avant d'être Autoclavé pendant 20 min à 120°C.

II.3.3.3. Protocole expérimental

On a choisis de travailler sur 2 levures qui sont : *Candida albicans* L24 et *Candida albicans* L36, les 2 levures sont procurées par laboratoire de microbiologie de faculté de science et de la vie d'Université de Larbi Tébessi de Tébessa. Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de 5 ml de l'eau physiologique puis homogénéisation par une faible agitation manuelle.

- **Préparation des boîtes**

Le sabouraud stérile bouillie dans le bain-marie pendant environ 1h du temps, après, la gélose coulé dans des boites de pétries dans un zone stérile par le Bec benzène puis laissées 1 heure pour la solidification.

- **Préparation des disques**

Des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre sont préparés par un appareil spécial puis stérilisé et les puits sont creusés dans la sabouraud grâce à une pince stérile.

- **Le repiquage des levures jeunes**

- Les disques ont été ensuite imprégnés chacun par 0,15 µl de extrait de grenade , cette opération est réalisée auprès de bec benzène.
- L'incubation a été faite pendant 24 à 48 h dans une étuve réglée préalablement à une température 37et 30 °C.

II.3.3.4. Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de zone d'inhibition qui a apparu autour les disques à l'aide d'une règle.

III. Résultats et discussions

III.1. Rendement de l'extraction

La préparation des extraits à partir d'écorces de la grenade a été effectuée par le solvant méthanol. Cette extraction a permis d'obtenir extraits brut: l'extrait méthanolique. Exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la poudre d'écorces, le rendement était 35,43% cette valeur est presque similaire au résultat de **Safi et Banbrahim (2016)** qui a rapporté de rendement en EMPG. de 33,91%.

Par contre, **Douaouri (2017)** enregistré un rendement plus élevée comparativement a notre qui a trouvé un rendement de 71,32%

III.2. Activité antioxydante

III.2.1. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH

La Figure 25 illustre les valeurs du pourcentage d'inhibition enregistrées lors de l'utilisation de l'EMG et la Vit C en fonction des doses. Les courbes ont une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire.

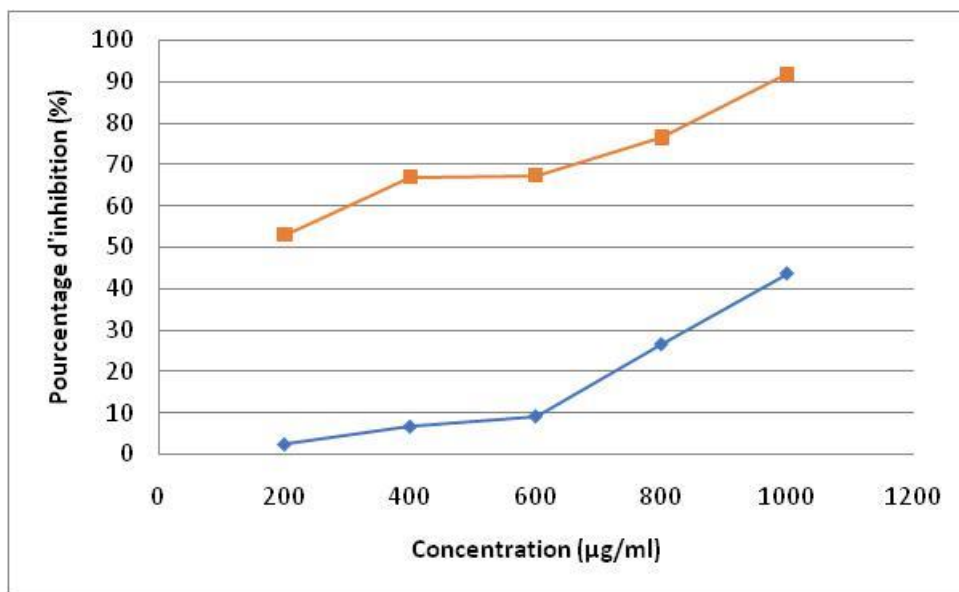


Figure 22. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations d'extrait de M.G du *P. granatum* et vit.C.

Ces résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation des concentrations que soit pour l'EMG ou pour la vit.C. On observe que pour la dose de 1000 µg/ml par exemple, le pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH pour la

vit C est largement supérieur à celui de l'EMG (43,61 % vs 91,86) et pour la dose de 200 µg/ml, le pourcentage d'inhibition de la vit C est très élevé (53,6%) comparé à celui de l'EMG (2,32%).

Ceci est en accord avec les travaux de **Safi et Benbrahimi (2016)** qui ont trouvé que l'activité antioxydante de l'EMG affiche un pouvoir inhibiteur du radical DPPH plus faible que la vit C. Ces auteurs rapportent, en utilisant une dose 5mg/ml, un pourcentage d'inhibition de 20,73% pour l'EMG contre 97,5% pour la vit C. Remarquons que le pourcentage d'inhibition de l'EMG enregistré dans notre étude est largement supérieur à celui rapporté par des derniers auteurs. En revanche, **Moualkia et Gourmati (2014)** ont observé que l'EMG possède une très forte activité antioxydante (94,71% à concentration de 500µg/ml). De plus, **Douaouri (2017)** a enregistré un pourcentage d'inhibition de 70,71 % pour l'EMG en utilisant une concentration de 0.063 mg/ml alors qu'il était plus de 90% de vit C.

III.2.2. Détermination de l'IC₅₀ (Concentration inhibitrice 50%)

À des fins comparatives, nous avons évalué l'IC₅₀ des deux composés (EMG et vit.C). Cet indicateur exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour faire décroître la concentration initiale du DPPH^{*} à la moitié (50%). L'IC₅₀ est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé. Cela veut dire que la capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC₅₀ est petite. Les valeurs de l'IC₅₀ ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire comme c'est illustré dans la Figure 26

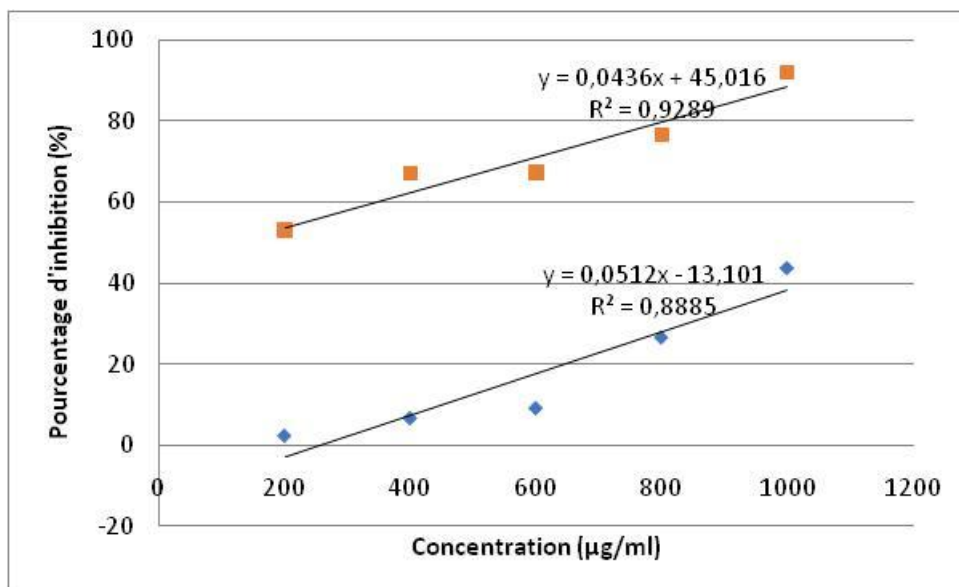


Figure 23 : Détermination de la valeur IC₅₀ de la vitamine C (orange) et de l'extrait (bleue).

En effet, L'IC₅₀ de l'extrait est 1232,44 µg/ml qui montrent une activité antioxydant très largement inférieur au vit C dont l'IC₅₀ était de 114,31 µg/ml. Ces résultats prouvent que le vit C reste l'antioxydant le plus efficace par apport à notre extrait.

L'activité antioxydante du grenadier et de ses dérivés a été largement étudiée ces dernières années. Plusieurs études ont été publiées dans ce contexte. En raison de sa richesse en polyphénols, les écorces et le jus de grenade sont connus pour posséder une activité antioxydante. Comparativement aux études réalisées au paravent, l'IC₅₀ enregistrée dans la présente étude est nettement supérieure à celle rapporté par **Moualkia et Gourmati (2014)** et **Douaouri (2017)**. En effet, ces auteurs rapportent une IC₅₀ de l'EMG de 747,02 µg/ml et 540 µg/ml respectivement. D'autre part, **Douaouri (2017)** a rapporté une valeur d'IC₅₀ pour la vit C très proche à la nôtre (130 µg/ml).

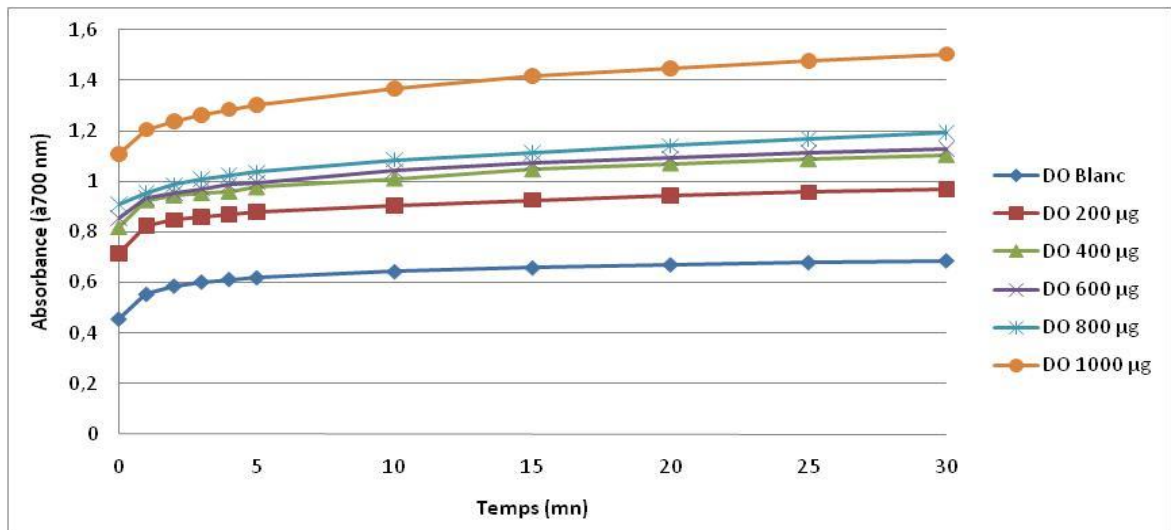
La différence de l'activité antioxydant observée entre ces différentes études peut être expliquée par la variabilité de la région et le moment de récolte du fruit, composition en différents composés phénoliques et aussi la différence dans le rendement des extraits. La réduction du DPPH n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais à l'interaction entre plusieurs composés, ces interactions peuvent exister dans un extrait et pas dans un autre, conduisant ainsi à cette différence d'activité entre les extraits. (**Bacco et al., 1998 ; Gorinstein et al., 2001**).

III.3. Etude cinétique de la réaction par le test de réduction du fer FRAP

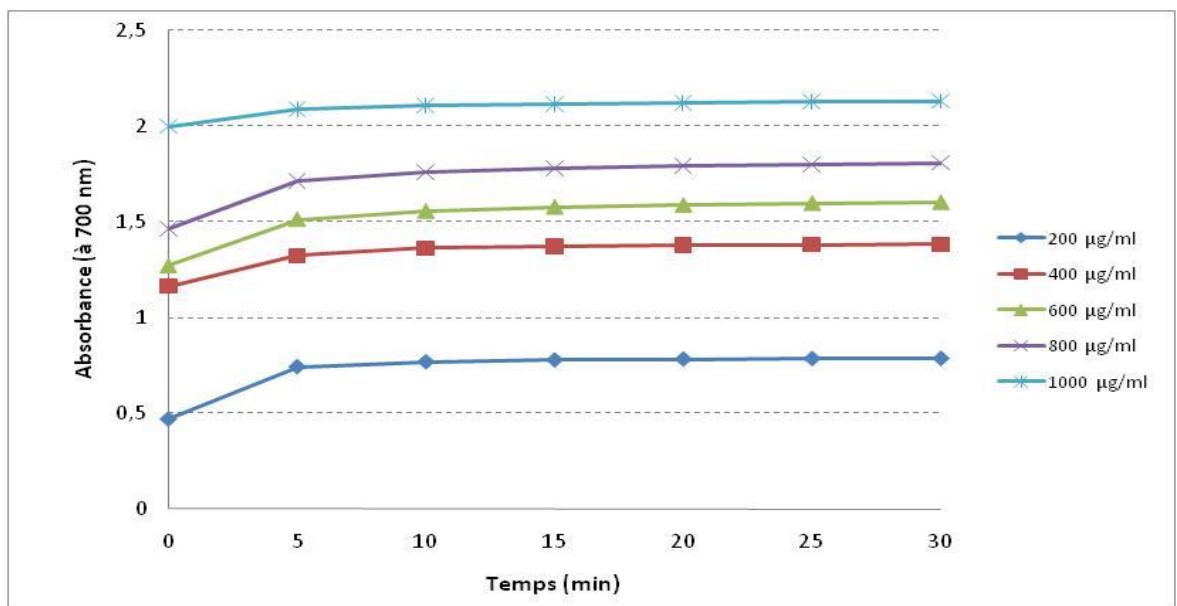
La figure 27 rapporte des courbes du le pouvoir réducteur d'extrait methalonique de *P. granatum* et de vit C à différentes concentrations en fonction de temps, qui sont tracer d'après les valeurs obtenus de notre étude. Quelle que soit la concentration utilisée, la réaction entre le fer ferrique et l'acide ascorbique (donneurs d'électron) atteint son maximum rapidement après 5 min. Ensuite l'évolution reconnaît une allure stationnaire jusqu'à 30 min. Ensuite, les valeurs de l'absorbances augmentent avec l'augmentation de la dose utilisée. Par exemple, après 30 min de réaction avec l'extrait, l'absorbance enregistrée. Pour, l'extrait methalonique de *P. granatum*, l'absorbance enregistrée après 30 min pour la dose de 200µg/ml est de 0,9664 nm alors qu'elle est de 1,5034 nm pour la dose de 1000µg/ml. Et pour la vit C la dose de 200µg/ml est de 1,9995 nm alors qu'elle est de 2,131 nm pour la dose de 1000µg/ml.

Nos résultats montrent que les valeurs d'absorbance enregistrées pour la vit C sont beaucoup plus élevés que celles enregistrées pour l'extrait et ce quelle que soit la dose utilisée et le temps de réaction écoulé. Par exemple, pour la dose de 200µg/ml et après 30 min de réaction, l'absorbance enregistrée pour la vit C est de 1,9995 nm et de 0,9664 nm pour notre extrait. Ces résultats

soulignent que le pouvoir antioxydant du vit C est beaucoup plus intense que celui de l'extrait méthanolique de *P. granatum*.



(a) l'extrait méthanolique de *P. granatum*.



(b) Le vit C.

Figure 24 : Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'acide ascorbique et extrait méthanolique de *P. granatum* avec le temps

Ce résultats est en parfaite concordance avec les travaux de **Douaouri (2017)** qui a rapporté que le pouvoir réducteur exercé par le vit C est très élevé par rapport à celui de l'extrait méthanolique des grenades. En effet, il a enregistré une absorbance égale à 1,2 nm de l'EMG contre 2,5 nm pour vit C à la concentration 50 µg/ml.

III.4. Activité antibactérienne d'extrait méthalonique de *P. granatum*

Le tableau ci-dessous présente les résultats des tests d'activité antibactérienne des d'extraits méthalonique de *P. granatum*.

Tableau 10 : Détermination du diamètre d'inhibition (mm) de l'EMG contre certaines souches bactériennes.

Bactéries	Répétitions	Diamètre d'inhibition (mm)	Moyenne de diamètre d'inhibition ± écart-type (mm)
<i>E. coli</i>	1	18,3	19,6 ± 1,20
	2	20,0	
	3	20,6	
<i>S. aureus</i>	1	16,0	16,8 ± 1,07
	2	18,0	
	3	16,3	
Micro	1	11,0	09,7 ± 1,16
	2	08,7	
	3	09,6	

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenue *in vitro* à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose montrent que l'activité antibactérienne de l'EMG varie en fonction des bactéries testées. Les résultats montrent que l'EMG possède une activité antibactérienne remarquable sur toutes les souches étudiées. En effet, l'activité la plus intense a été enregistrée pour *E. coli* avec un diamètre d'inhibition de 19,6 mm, suivie par *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition de 16,8 mm. Enfin, l'activité la plus faible a été enregistrée pour Micro avec un diamètre d'inhibition de 09,7 mm (Figure 28).

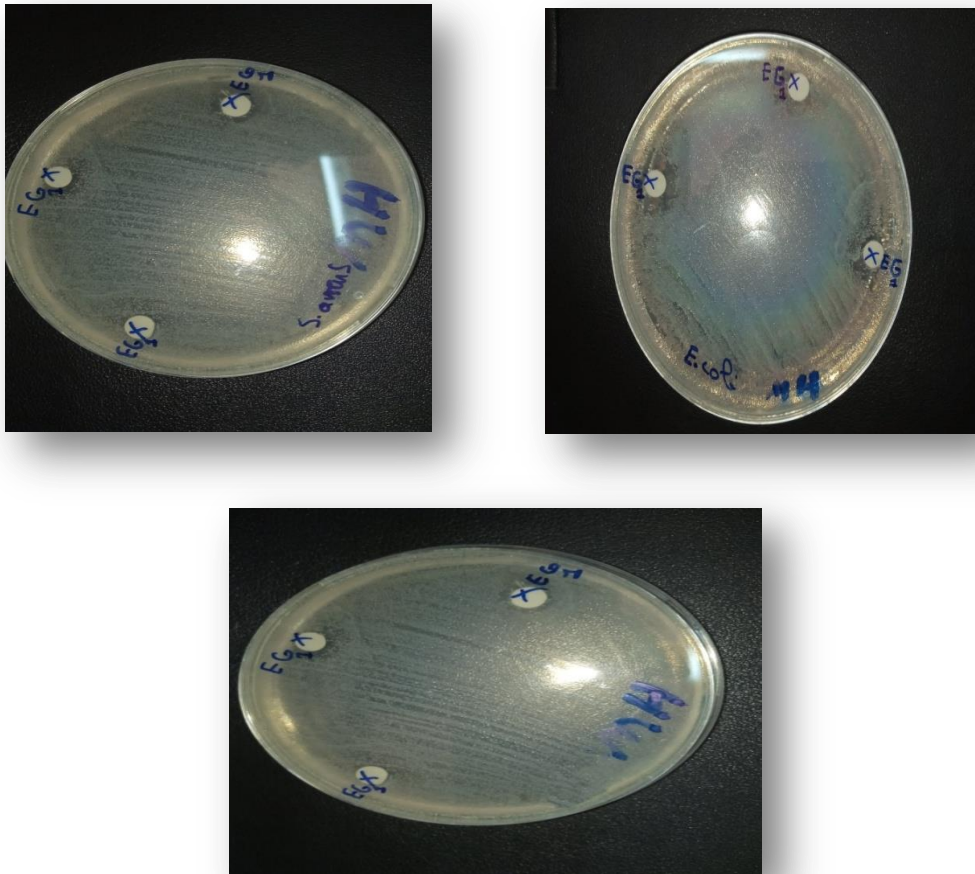


Figure 25 : Résultats des tests antibactériens de l’EMG vis-à-vis des bactéries : *E. coli*, *S. aureus* et *Micoro* (Photo personnelle).

Nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux rapporté dans la littérature. En effet, **Safi et Benbrahim (2016)** enregistrent des diamètres d’inhibition pour *Staphylococcus aureus* de 12,5 mm 14,5 mm et 15,5 mm avec une concentration de 20mg/ml et 40mg/ml. D’autre part, **Mouali et Gourmati (2014)**, ont observé des diamètres de 12,5 mm pour *E. coli* et de 9.5 mm pour *S. aureus* lors de l’utilisation de l’extrait méthanolique de l’écorce de *P. granatum* par la méthode de la diffusion sur disque.

L’activité antibactérienne de l’EMG peut être expliquée par sa composition en substances actives. En effet, **Cowan (1999)** a rapporté que les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique.

III.5. Activités antifongique d’extrait méthalonique de *P. granatum*

Les résultats des tests d'activité antifongique des d'extraits méthalonique de *P. granatum* sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11: Détermination du diamètre d'inhibition (mm) de l'EMG contre certaines souches de levures.

Bactéries	Répétitions	Diamètre d'inhibition (mm)	Moyenne de diamètre d'inhibition \pm écart-type (mm)
L24	1	19,3	19,00 \pm 0,55
	2	18,4	
	3	19,3	
L36	1	20,6	19,7 \pm 0,88
	2	19,3	
	3	19,0	

L'extrait méthanolique de l'écorce de la plante *P. granatum* possède un effet antifongique très élevé sur les 2 souches étudiées (L24 et L36). Les résultats montrent que l'activité antifongique de l'EMG varie en fonction des souches testées. En effet, nous avons enregistré une activité plus intense vis-à-vis de la souche L36 avec un diamètre d'inhibition de 19,7 mm contre un diamètre d'inhibition de seulement 19,00 mm contre la souche L24 (Figure 29).

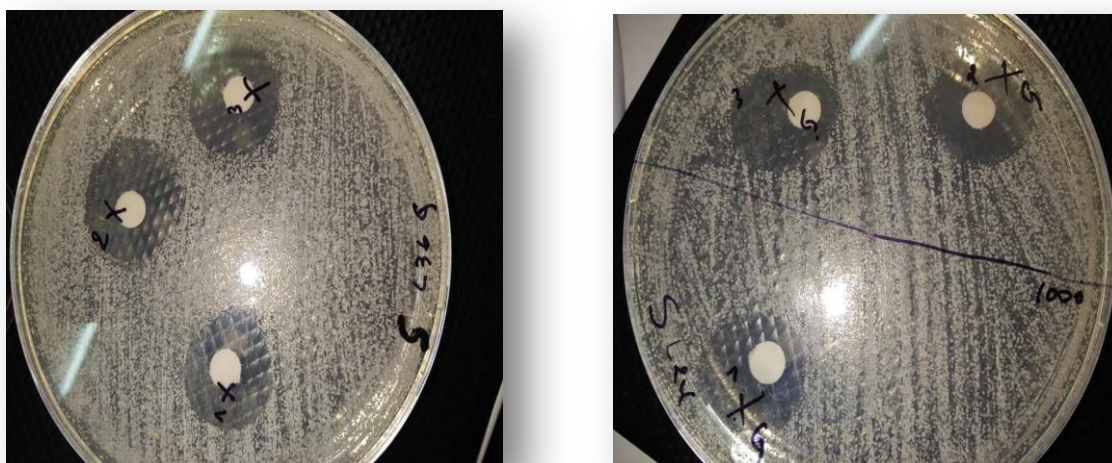


Figure 26 : Résultats des tests antifongiques de l'EMG vis-à-vis des souches étudiées : L24 et L36. (Photo personnelle).

Nos résultats concordent parfaitement à ceux rapporté par **Safi et Benbrahim (2016)** qui ont évalué l'activité antifongique de l'EMG sur différentes souches de *C. albicans*. Ces auteurs ont rapporté des diamètres d'inhibition qui varient entre 13,25 mm pour la souche CA1 à 25 mm pour la souche CA2c. **Safi et Benbrahim (2017)** ont également estimé l'activité antifongiques d'aitre extrait des grenades : éthanolique te acétonique. Ils ont rapporté des diamètres d'inhibition variant de 15,5 (CA1) à 20,75 mm (CA3₂) pour l'extrait éthanolique et de 12,5 mm (CA2c) à 25 mm (CA3₂) pour l'extrait acétonique.

Par contre **Bendjabeur (2012)** qui a évalué l'activité antifongique de plusieurs types d'extraits (méthanolique, acétonique et acétate d'éthyle) sur *C. albicans*. Ces auteurs n'ont pas rapporté d'effet antifongique de tous ces extraits sur *C. albicans*. La différence entre ces résultats et les nôtres peut être expliquée par la variabilité de la composition en différents composés phénoliques. Cette variabilité peut être rendue la région, au moment de récolte du fruit et aussi la au rendement des extraits (**Bacco et al., 1998 ; Gorinstein et al., 2001**).

Conclusion

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressées à l'estimation du potentiel antioxydant, antibactérien et antifongique de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade (*Punicagranatum* L).

L'évaluation de l'activité antioxydant du l'EMG est imée par deux les méthodes (piégeage du radical libre DPPH et pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP)) a permis de conclure que le pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH pour la vit C est très supérieur à celui du l'EMG (91,86% vs43,61%) dans 1000µg/ml. Ainsi, L'IC₅₀ de l'EMG était de 1232,44 µg/ml alors que celle de la vit C était de 114,31 µg/ml. D'autre part, la méthode de FRAP a montré que l'absorbance enregistré pour la vit C était de 1,9995 nm et alors que celle de l'EMG était de 0,9664 nm. Ce souligne que le pouvoir antioxydant de la Vit C était largement supérieur à celui de notre extrait.

L'activité antibactérienne et antifongique de l'EMG été testée sur des bactéries gram⁻ (*E.coli* et *M. luteus*) et Gram⁺ (*S.aureus*) et 2 types de champignons (*C. albicans* L24 et L36) par la méthode de diffusion sur disque. Les zones d'inhibitions varient pour les bactéries entre 8,7 et 20,6 mm, et entre 17 et 22 mm pour les champignons

D'après ces résultats nous pouvons conclure que notre extrait possède des activités biologiques (Antioxydante, antibactérienne et antifongique)qui nous permettent de l'utilisé a la place de certains substances antioxydante et certains antibiotiques. Finalement, notre travail n'est qu'une étape primaire et sans doute des travaux approfondis sur une large gamme de souches microbiennes peuvent certainement être entamés dans le futur. L'identification des constituants actifs de l'EMG responsables de ces activités constituent également une piste à suivre dans toute recherche future.

Références bibliographiques

-A-

AlMuammar, M. N. and F. Kan(2012). Obesity : the prevention role of the pomegrante (punica granatum) . Nutrition 28(6) : 595604.

AlSaid F.A., Opara U ;L AlYayai R.A. (2009). Physicochemica and textural quality attributes of pomagranate cultivars (punicagranatum L.) grownin the Sultanate of Oman. Journal of Food Engineering 90 :129134 ;

Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonogai, Y., 2000a. Determiration of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. J. Chromatogr. 891, pp. 183–188.

-B-

Bartosz G., 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systéms. Comments on toxicology , 9 :521.

Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. mt cardio, volume 2,

Bellakhdar J.2006. Plantes médicinales au Maghreb et soins de base, précis de phytothérapie moderne. Le Fennec, Casablanca Maroc. pp.1745.

Ben Abdennebi A.M., 2012. Le grenadier tunisien (Punica granatum) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino dépendante de l'Akt et la voie insulinoindépendante de l'AMPK. Diplôme – Maitrise en Pharmacologie, Université de Montréal.

Bendjabeur salah, 2012 ; Evaluaion du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de grenade de punica granatum L) en vue de leur utilisation alimentaire

Benmeziane D. Bedja B, (2012). Effet de l'extrait de l'écorce de deux variétés de grenade (Quares et Lahlou) sur Candida albicans.

Berger M . (2006). Manipulation nutritionnelles du Stress oxydant : état de connaissances . Nutrition chimique et métabolisme 20 : 4853

Blois, M.S. 1958. Antioxydant determinations by theuse of a stable free radical, Nature, 181: 1199

Bocco, A., Cuvelier, M.E. Richard, H., Berset, C. (1998). Antioxydant Activity and Phenol Composition of Citrus Pell and Seed Extracts. J. Agric. Food Chem, 46(6): 212323.

Références bibliographiques

Bondet, V., BrandWilliams, W. and Berset, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method, *LebensmittelWissenschaft und Technologie/FoodScience and Technology*, 30: 609-615.

Bonnefont –Rousselot D, Raji B ; Wolrand S ; Gardés –Albert M ; Jore D ; Legrand A ; peyenet ; Vasson MP. (2003) . An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of met formin towards oxidative stress .*métabolisme* , 52(5) :5869

Bougandoura N., Bendimerad N., Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technologie*. (2013) ; (9): 15p.

BrandWilliams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LebensmittelWissenschaft und Technologie/Food Science and Technology*, 28:2530.

Brouillard, R., 1986. The flavonoids Advances. In: research since 1993. Harborne J B, Chapman and Hall, London. 525-538 p.

Burits M., Bucar F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, vol 14, no 5, p. 323-328.

-C-

Chang S.T., Wang S.Y., Wu C.L., Su Y.C. et Kuo Y.H. 1999. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania (Taiwania cryptomerioides Hayata)* heartwood. *Holzforschung*. vol : (53) .487-490.

Cowan M.M. (1999) . Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 : 564-582.

-D-

Daponte , M.(2013) . Glutathion catalyses and the reaction mechanism of glutathion dependent enzyme *Biochim Biophys Acta* 1830(5) : 3217-3266

Dean, F.M., 1963. Naturally occurring Oxygen Ring Compounds. Butterworths. Londres. P 148.

Defraigne J.O. Pincemail. J (2008) STRESS OXYDANT ET ANTIOXYDANTS : mythes et réalités *Revue Médicale Liège* 2008; 63 : Synthèse 10 2008 : 1019

Références bibliographiques

Dorman HJ, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plantes : antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88 :308316.

DOUAOURI Nor El Houda, 2017 ; Contribution à une étude phytothérapeutique, antiinflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum L.*) – Etude in vivo

Droge , K.S. (2002) . Free radicals in physiological control of cell function *physiol Rev* .Vol 82: 4795.

-E-

Elamimi iman, 2017 ;Études phytochimiques et la propriété antioxydante d'écorce de fruit de la plante *punica granatum l.*

Elodie W . (2009). Le grenadier (*punicagranatum*) : Plante historique et évolutions thérapeutique écentes. Faculté de pharmacie , université HenripoincareNancy1.

-F-

Fabre B. Ermosilla V . (2008). Uses of pomegranate tree extract for hear color retention. U.S patent.

Fahn, S ., Cohen, G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease : evidence

Favier. A. (2003). Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique l'actualité chimique novembredécembre 2003

Favier. A. 2006. Le stress oxydant, Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr.* 2006.108115 pp.

Fawole O.A., Opara U.L. Theron k.I. (2011). Chimical and phytochemical properties and antioxydant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa . *Food Bioprocess Technology*

Fleuriet, A., JayAllemand. C.. Macheix. J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121 216.

Free radicals in biology and medicine, second edition b; Oxford, Clarendon press: 50924.

Références bibliographiques

-G-

Gabor, M., Cody, V., Middleton, E.J., Harborne, J.B., Beretz, A., Liss, A.R., 1988. Plants Flavonoids in biology and Medecine II; Biochemical. Cellular and Medecinal properties. New York. 115 p.

Garait. B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) Ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse doctorat. Université Joseph Fourier. Grenoble 1 SciencesTechnologieSante. P : 197.

Gil, M. I., F .A. TomasBarberan, et al. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relation ship with phenlic composition and processing. J Agric Food Chem 48 (10) : 45814589.

Gorinstein, S., Martinbeloso, O., Park, Y.S et al (2001). Composition of some biochemical characteristics of different citrus fruit. Food Chem, 47(3): 115309

Guignard, J.L., 1996. Abrégé de biochimie végétale.Ed. Masson. Paris. 160 p.

-H-

Harbone, J.B., Grayer, R.J., 1988. The flavonoids, Advances. In: research since 1980. Harboirne J B, Chapman and Hall, London, 120 p.

Harborne. J., Baxter. H., 1993. Phytochemical dictionary. Taylor and Francis, London.

Hemingway, R.W., 1992. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : Lpant polyphenols: synthesis, properties, significande. Hemingway R W, Laks P. E. New York.

Holland D.,Hatib K., BarYa'akov I. (2009) . Pomegranate : botany, horticulture, breeding, Horticultural Reviews, 35 :127191.

Huang D., ou B., Prior R .L.2005. The chimistry behind antioxidant capaciati assays .Journal OF Agricultural and FOOD Chemistry, 53 :18411856.

-I-

Issaadi.O. (2010). Etude comparative des activités antioxydantes de deux fruits : la mûre et l'arbose. Thèse doctorat. Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Références bibliographiques

-J-

Jurenka J., 2008. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative medicine review*, vol 13, no 2, pp. 128.

-K-

Kang. K., Fong. W. et Tsang. P., 2010. Novel antifungal activity of purpurin against *Candida* species in vitro. *Medical Mycology*, 48, p.p. 904911.

Khoudali S, Benmessaoud left D, Essaqui A., Zertoubi M, Azzi M, Benaissa M. 2014. Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(3): 887898

Kim. J., Haff. R., Faria. N., Martins. M., Chan. K. et al., 2013. Targeting the Mitochondrial Respiratory Chain of *Cryptococcus* through Antifungal Chemosensitization: A Model for Control of NonFermentative Pathogens. *Molecules*, 18, p.p. 88738894.

Koechlin Ramonatxo. C. (2006).Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Science directe .Nutrition clinique et métabolisme* 20 (2006) 165–177.

-L-

Lahou M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oilsphytotherapy research. 18 : 435448.

Lairini, R., Bouslamti, F., Zerrouq et A., Farah. 2014. Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante. *J. Master. Environ. Sci.* 5(S1) : 23142318, ISSN : 20282508.

Laughton, M. J., Halliwell B., Evans, P. J.,Robin, J.&Hoult, S. (1989). Anioxidant and prooxidant actions of the plant phenolts quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology*38(17), 28592865. Librairie FX. de Guibert, PP : 257.

Lliwell, B., et Gutteridge, JMC. (1989). A consideration of atomic structure and bounding.

Références bibliographiques

-M-

- Malagas, D., 1992.** Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT Karthala. p. 232.
- Marfak. A. (2003).** radiolyse gamma des flavonoïdes. Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse doctorat. L'université de Limoges Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé P : 199
- Meddleton, E., Kardasnam, J.C., 1993.** The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London, 617652 p. Médecine thérapeutique Cardiologie, Volume 1, Numéro 3, 131139.
- MedicSanic, M., Jasprica, I., SmolicBubalo, A., Mornar, A., 2004.** Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. Croatica chemica acta. 361366 p.
- Milane Hadi. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. Strasbourg.
- Morelle, J., et Israel, L. (2003).** L'oxydation des aliments et la santé. Edition Impression
- MOUALKIA HALIMA et GOURMATI MERYEM, 2014 ;** Détermination de substances naturelles a potentialités antioxydante et anti inflammatoire de plantes Punica granatum L et Lawsonia inermis1200.

-N-

- Nagata. T., Tsushida. T., Hamaya. E., Enoki. N., Manabe. S. et Nishino. C., 1985.** Camellidins: antifungal saponins isolated from Camellia japonica. Agric Biol Chem 49, p.p. 1181–1186.
- NegreSalvayre, A ., et Salvayre, R. (2005).** Effet protecteur des acides gras contre le stress
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003)** Natural products as sources of new drugs over the period 19812002 .J. Prod. 66 : 10221037.
- Novelli, G.P. (1997).** Role of free radicals in septic shock. J Physiol Pharmacol, 48 , 517527.
- numéro 1, 4352.

Références bibliographiques

-O-

O'fel. A., 1982. Parasitologie, Mycologie : Maladies parasitaires et fongiques, Association des professeurs de parasitologie. Paris : E.Crouan et Roques, p.p. 349.

Olli. S., Kirti. P., 2006. Cloning, characterization and antifungal activity of defensin Tfgd1 from *Trigonella foenumgraecum* L. *J Biochem Mol Biol* 39, p.p. 278–283.

OMS,2005. La résistance aux antimicrobiens : une menace pour la sécurité sanitaire mondiale.58/14 :15.oxydatif : Implication en physiopathologie vasculaire. OCL volume, numéro 12 56,433438.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

-P-

Packer J. E., Slater T. F. et Willson .R. L, (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278:737738

Pincemail .J. Bonjean .K. Cayeux .K. Olivier Defraigne .J. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme* 16 (2002) 233–239.

Planchon et Collin, 1875) Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale. Librairie F. Savy. 1875. Tome I. Pages 235236 et 307308

Prescott LM , Harley JP, Klein DA (1995) Microbiologie. De Boeck ed. p 1014.

Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 53: 4290302.

Psotova, J., Lasovsky, J., Vicar, J., 2003. Metal chelating properties. Electrochemical behavior. Scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. *Biomed. 174153 p. Purification Technology*, 54, 4450.

-Q-

Qnais, E. Y., Elokda, A. S., Abu Ghalyun, Y. Y. et Abdulla, F. A. 2007. Activité anti diarrhée de l'extrait aqueux de l'écorce de *Punica granatum* (Grenadier). *Biologie pharmaceutique*, VOL. 45, No. 9, pp. 715720 10, ISSN 19960875.

Références bibliographiques

-R-

Rabaud, Ch., Tronel, H., Fremont, S., May, T., Canton, P., Nicolas, J.P. (1997). Radicaux libres et infection par le VIH. *Annales de Biologie Clinique*, volume 55, numéro 6, 565-571.

Ribereau-Gayon, J., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. *Traité d'œnologie*. Edition Dunod. Paris. 254 p.

-S-

SAFI AHLEM et BENBRAHIM, 2016 ; RACHIDA Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques d'extrait des écorces de *Punica granatum* (Grenade)

Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1990. Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton. Florida: CRC press. Pp 113-146.

Sampayo, J.N., Gill, M.S., Lithgow, G.J. (2003). Oxidatif stress and ageing: the use of superoxide dismutase / catalase mimetics to extend lifespan. *Biochemical Society Transactions*, 31, 1305-1307.

Sharififar F. , Moshafi M.H. , Mansouri S.H., Khodashenas M. & Khoshnoodi M., "In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss", *Food Control*, 18, 2007, p: 800-805.

Sharrif Moghaddasi, M. et Haddad Kashani, H. 2012. Composition chimique de la plante *Punica granatum L.* (Grenadier) et ses effets sur le cœur et le cancer ». *Journal de recherche des plantes médicinales*. Vol. 6(40), PP.530-653

Singh SB, Barrett JF (2006). Empirical antibacterial drug discovery: foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71 : 1006-1015

Singleton V.L, Rossi J.A.J.R, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult*, 16: 144-58.

Spichiger R E., Savolainen V., et al., 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Editions Presses polytechniques et universitaires romandes. Troisième édition. 2004. 413 page.

Spiller, G. & Spiller, M. (2007) Tout savoir sur les fibres. Editions le mieuxetre p27.

Storey T. (2007). La grenade, le fruit médicament. *Santé*, 51 : 46-47.

Références bibliographiques

Suhr K.I. et Nielson P. V. (2003). Antifungal activity of essential oil evaluated by two different application technique against rye bread spoilage fungi. **Journal of Applied Microbiology. 94 :** 174177.

SunchezMoreno C ., Larrauri J. A., et Sauracalixto F(1998). A procedure to measure the antiradial efficieneny of polyphenols. Journal Science Technology Internatinal. 8, 121137 supporting it. Ann Neurol, 32, 804812.

-V-

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) . Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stressinduced cancer. Chemicobiological interactions. 160: 140

Vergely, C., et Rochette, L. (2003). Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire.

-W-

Walker. G., White. N., 2011. Introduction to Fungal Physiology. In: Fungi: Biology and Applications, Kavanagh K (ed) John Wiley and Sons, Ltd , UK.

Wang. W., Wu. N., Zu. Y. G. et Fu. Y. J., 2008. Antioxidant activity of Rosmarinus officinalis L oil compared to its main compounds. Food chemistry, 108, 3, p.p. 10191022.

Wright G.D et Sutherland A.D.2007. New strategies for combating multidrugresistant bacteria. Trends MolMed.13 (6) :2607.

-Y-

Young. M., Braga. M., Dietrich. S., Gottlieb. H., Trevisan. L. et Bolzani. V., 1992. Fungitoxic nonglycosidic iridoids from Alibertia macrophylla. Phytochemistry, 31, p.p. 3433.