



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université de Tissemsilt
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

**Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme
de Master académique en**

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présentée par : OULDRABAH Nadjat

BAROUD Aicha

THÈME

**Etude de l'activité antibactérienne des extraits d'écorces de
grenade (*Punica granatum*) Mozaya (Blida)**

Soutenu le, 13 /06/2023

Devant le Jury :

| | | |
|----------------------|--------------|------------------------|
| BEGHALIA Mohamed | Président | Prof. Univ-Tissemsilt |
| BEKADA Ahmed Med Ali | Encadreur | Prof. Univ-Tissemsilt |
| SETTI AHMED Kheira | Examinatrice | M.C.B. Univ-Tissemsilt |

Année universitaire : 2022-2023

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la santé et les moyens afin de réaliser ce mémoire.

Nous voudrions adresser toute notre gratitude au promoteur de ce mémoire: Monsieur BEKADA. A, professeur à la faculté des sciences de la nature et de vie -Université de Tissemsilet pour sa patience, sa disponibilité, ses précieux conseils et son aide durant toute la période du projet.

Mes remerciements aussi à l'ensemble des membres de mon jury BEGHALJA Mohamed et SEFFI Kheira, d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail ou qui m'ont fait l'honneur de le juger.

Nous remercions monsieur Dris pour tous les efforts qu'il a déployés pour nous et pour être à nos côtés.

Un grand remerciement à monsieur Mohamed l'ingénieur de laboratoire à la faculté des sciences de technologie.

Un grand remerciement de Faculté des Sciences et de la Technologie et Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Dédicaces

♥ *Grace a la volonté divine d'Allah notre dieu tout puissant et bien veillant qui a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail, que je dédié !*

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit . Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

♥ *Je le dédit également :*

Mes très chers frères : Walid et younes

Ma très chère sœur : Hayet

Et la petite fleur de la maison : Ritadj

♥ *Une dédicace spéciale à mes frères qui ne sont pas nés de ma mère : Abd lgani, Abd rahman, ayoub.*

♥ *Et toute ma famille*

♥ *Je dédie mon collègue dans ce travail :Aicha*

♥ *Et tous mes collègue : karima , Asmaa, Ilham, Romaiissa, Soumia*

NADJES



Dédicaces

Avant toute chose, je remercie ALLAH pour m'avoir donné la force, la volonté, et la patience durant toutes mes années d'étude.

Je dédie ce travail à :

A ma chère mère pour sa tendresse, son amour, son affection, sa patience, et ses valeureux conseils durant mes années d'études.

A mon père pour son soutien, sa gentillesse, son aide et sa confiance.

Que dieu les gardes en bonne santé toujours.

A tous mes chères frères : Sofien, Yasser, Amine, Lokman et toute ma famille

Je dédie mon collègue dans ce travail : Nadjet

Et tous mes collègues : Ilham, Asma , Romaiissa , Karima

ALCHA

Résumé

Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit à la recherche des substances naturelles à partir des extraits végétaux dotés d'activité antibactérienne.

Punica granatum est l'une des plantes médicinales connue depuis l'Antiquité pour son effet thérapeutique.

Notre étude a pour but d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et hydro-éthanolique sur deux souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

L'extraction des composés bioactifs a été effectuée à partir la poudre de la peau de la grenade *in vitro*, Les extraits obtenus ont été dilués à 20% ,40%,60%,80 et 100%. Les mesures et les contrôles ont été réalisés en deux essais par la méthode de diffusion des disques en milieu solide MH , Les résultats d'extrait hydro-éthanolique ont montré un effet inhibiteur sur la croissance de la bactérie *P.aeruginosa* qui varie selon les concentrations en composés bioactifs de la grenade et aucun effet n'a été obtenu quel que soit l'extrait aqueux ou hydro-éthanolique sur *S. aureus*. On peut ainsi considérer les extraits de grenade comme une alternative de traitement et peuvent être utilisés dans domaine médicale.

Mots clés : *Punica granatum* L, activité antimicrobienne, extrait aqueux, extrait hydro-éthanolique.

Abstract

The development of microbial resistance to antibiotics has led to the search for natural substances from plant extracts with antibacterial activity.

Punica granatum one of the medicinal plants known since antiquity for its therapeutic effect.

The purpose of this study is to evaluate the antimicrobial activity of the aqueous and hydro-ethanol extract on two pathogenic strains (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

The extraction of the bioactive compounds was carried out from the powder of the skin of grenade *in vitro*, The extracts obtained were diluted to 20%, 40%,60%,80 and 100%. The measures and the tests were carried out in two tests by the method of diffusion of the discs in the medium solid MH , The results of hydro-ethanolic extract showed an inhibitory effect on the growth of the bacteria *P.aeruginosa* that varies according to the concentrations of bioactive compounds of pomegranate and no effect was obtained regardless of the aqueous or hydro-active extract ethanolic on *S. aureus*. Pomegranate extracts can thus be considered as an alternative treatment and can be used in the medical field.

Key words: *Punica granatum* L, antimicrobial activity, aqueous extract, hydro-ethanol extract.

ملخص

أدى تطور المقاومة الميكروبية للمضادات الحيوية الى البحث عن مواد طبيعية من المستخلصات النباتية ذات النشاط المضاد للبكتيريا *Punica granatum* هو احد النباتات الطبية المعروفة منذ العصور القديمة لتأثيرها العلاجي

تهدف دراستنا الى تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص المائي الإيثانولي المائي على السلالتين ممرضتين (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*)

تم استخلاص المركبات النشطة حيويًا من مسحوق قشور الرمان في المختبر وتم تخفيف المستخلصات بنسبة 20% ,40%,60%,80 et 100%

تم اجراء القياسات و الضوابط في اختبارين بطريقة انتشار الأقراص في الوسط الصلب MH

أظهرت نتائج المستخلص المائي الإيثانولي تأثير تثبيط على نمو البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* والتي تختلف باختلاف تركيزات المركبات النشطة بيولوجيا من الرمان ولم يتم الحصول على أي تأثير مهما كان المستخلص المائي او الإيثانولي المائي على *Staphylococcus aureus* وبالتالي يمكن اعتبار مستخلصات قشور الرمان كعلاج بديل ويمكن استخدامها في المجال الطبي

الكلمات الرئيسية: نشاط المضاد للميكروبات, مستخلص مائي , مستخلص الإيثانولي المائي, *Punica granatum*.

Liste des abréviations

| | |
|------------------------------|---|
| ATCC: | American type culture collection |
| <i>P.granatum:</i> | <i>Punica granatum</i> |
| ATB : | Antibiotique |
| <i>S. aureus :</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>P.aeruginosa :</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| MH : | Mueller Hinton |
| BN : | Bouillon nutritif. |
| EA : | Extrait aqueux |
| EHET : | Extrait hydro- éthanolique |
| G+ : | Gramme négatif |
| G⁻ : | Gramme positif |
| PRL : | Pipéracilline |
| P : | Pénicilline |
| VA : | Vancomycine |
| LEV : | Lévofoxacine |
| TC : | Ticarcilline |
| FF : | Fosfomycine |
| ROS : | Les espèces réactives de l'oxygène |
| MCF : | Cellules tumorales mammaires |
| NF-KB : | pour nuclear factor-kappa B |
| UVA : | ultra violet de longueur d'onde courte |
| UVB : | ultra violet de longueur d'onde moyenne |

Liste des figures

Figure 1 : Le grenadier. *Punica granatum L.*

Figure 2 : L'écorce de grenade.

Figure 3 : Fleur de grenade.

Figure 4 : Grain de grenade.

Figure 5 : Structure chimique d'un tanin hydrolysable et tanin condensé.

Figure 6 : Image MEB de *Staphylococcus aureus*.

Figure 7 : *Pseudomonas aeruginosa*.

Figure 8 : L'écorce avant et après le broyage.

Figure 9: Les étapes de l'extraction aqueuse d'écorce de grenade.

Figure 10 : Les composants pour préparer un extrait

Figure 11 : Macération sous agitateur magnétique.

Figure 12 : Evaporation de l'extrait hydro-éthanolique.

Figure13 : Protocole de préparation de l'extrait éthanolique par macération.

Figure14: Préparation des différentes dilutions de l'extrait hydro-éthanolique.

Figure 15: Préparation des différentes dilutions de l'extrait aqueux

Figure 16 : Spectrophotomètre

Figure 17 : Préparation des boîtes pétrie.

Figure18 : Ensemencement sur milieu MH.

Figure19 : Application des disques.

Figure20 : Dépôt de l'extrait sur les disques.

Figure 21 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueuse de l'écorce de grenade sur les deux souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Figure 22 : Histogramme présentant les diamètres d'inhibition de l'extrait aqueux de *Punica granatum* sur les deux souches testés *S.aureus* et *P.aeruginosa*.

Figure 23 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydro-éthanolique de l'écorce de grenade sur les deux souches testées *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Figure 24 : Histogramme présentant les diamètres d'inhibition de l'extrait hydro-éthanolique de *Punica granatum* sur les deux souches *S.aureus* et *P.aeruginosa*.

Figure 25 : Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques sur les deux souches testées *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Position systématique de grenadier (**Spichiger, 2004**).

Tableau 2 : Classification de *S-aureus*.

Tableau 3: Classification de *P-aeruginosa*.

Tableau 4: Liste des souches microbiennes testées.

Tableau 5 : Liste des antibiotiques.

Tableau 6 : Résultats de l'aromatogramme des extraits aqueux exprimés par la diamètre de la zone d'inhibition (mm).

Tableau 7 : Résultats de l'aromatogramme des extraits éthanoliques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm).

Tableau 8: Résultats de l'antibiotique exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm).

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Chapitre I Données bibliographiques sur la grenade

| | |
|---|---|
| 1. Description botanique | 5 |
| 1.1. Appareil végétatif..... | 5 |
| 1.1.1 Les feuilles | 5 |
| 1.1.2 Les arilles | 5 |
| 1.1.3 L'écorce du fruit | 5 |
| 1.2 Appareil reproducteur..... | 6 |
| 1.2.1 Les fleurs | 6 |
| 1.2.2. Les fruits..... | 7 |
| 1.2.3. Les grains | 7 |
| 2. Nomenclature | 8 |
| 3. Classification botanique | 8 |
| 4. Habitat et répartition géographique..... | 8 |

Chapitre II Composition de la grenade (phytochimie)

| | |
|------------------------------|----|
| 1. Composés phénolique | 10 |
| 2. Flavonoïdes | 10 |
| 3. Flavonols | 10 |
| 4. Alcaloïdes | 10 |
| 5. Tanins | 10 |
| 6. Anthocyanines..... | 12 |

Chapitre III Activités biologiques et utilisation de la grenade

| | |
|---|----|
| 1. Les activités biologiques de la grenade | 14 |
| 1.1. Activité antioxydant | 14 |
| 1.2. Activité antimicrobien | 15 |
| 1.3. Activité anti-inflammatoire | 16 |
| 1.4. Activité anti-cancéreuse | 16 |
| 2. Utilisation de <i>Punica granatum</i> L..... | 17 |
| 2.1. Utilisations agroalimentaire | 17 |
| 2.2 Utilisation industrielle | 17 |
| 2.2.1. Le tannage et la teinture | 17 |
| 2.4.Utilisation dans la médecine traditionnelle | 18 |

Chapitre IV : Données bibliographiques sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

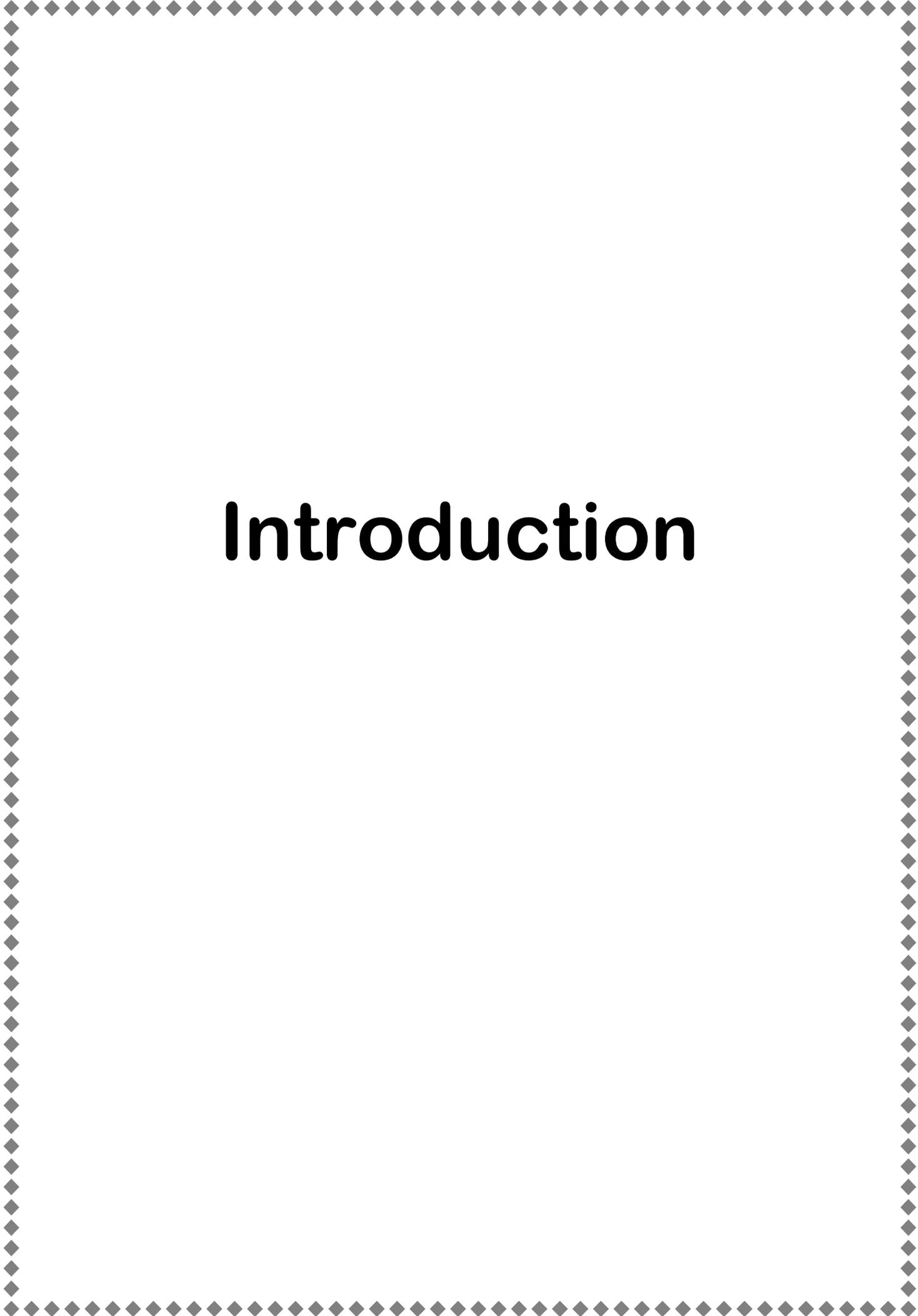
| | |
|--|----|
| 1. Les bactéries cibles..... | 20 |
| 1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 |
| 1.1.1. Caractéristiques | 20 |
| 1.1.2. Taxonomie..... | 21 |
| 2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 21 |
| 2.2.1. Caractéristiques | 21 |
| 2.2.2. Taxonomie..... | 22 |

Partie Pratique

Chapitre I: Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Objectif..... | 25 |
| 2. Lieu de l'étude..... | 25 |
| 3. Matériel de laboratoire | 25 |
| 4 Matériel végétal..... | 25 |
| 4.1. La récolte de la plante | 25 |
| 4.2. Séchage | 25 |
| 4.3. Broyage | 25 |
| 4.4. Conservation..... | 26 |
| 5. Matériel biologique microbien | 26 |
| 6. Extraction des composés phénoliques | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1. Extraction aqueuse | 26 |
| 6.2. Extraction hydro- éthanolique | 28 |
| 6.2.1. Evaporation | 28 |
| 7. Préparation des différentes solutions expérimentales | 29 |
| 8. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits étudié | 30 |
| 8.1 Préparation des milieux de culture | 30 |
| 8.2 Activation de la souche bactérienne | 30 |
| 8.3 Méthode de diffusion sur milieu gélosé | 30 |
| 8.3.1. Culture des bactéries | 30 |
| 8.3.2. Dépôt des extraits | 31 |
| 8.3.3. La conservation des boites de pétri | 31 |
| 8.3.4. Lecture des résultats | 31 |
| Chapitre II : Résultats et Discussion | |
| 1. Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de grenade | 33 |
| 1.1. Extrait aqueux | 33 |
| 1.2. L'extrait hydro- éthanolique..... | 35 |
| 1.3. Résultats de l'antibiogramme | 36 |
| 2. Discussion | 38 |
| Conclusion..... | 41 |
| Références bibliographiques | 43 |



Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement pour soulager, traiter et soigner toutes sortes de maladies. Les propriétés des plantes médicinales thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés les métabolites secondaires. Ces derniers se s'accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (**Pascual et al., 1984; Fleuriet et al., 2005; Zeggwagh et al., 2013**).

Selon **Saihi Razika, (2011)** Les plantes médicinales sont employées en nature ou sont utilisées comme matières premières pour l'extraction de principes actifs. Elle peuvent servir de modèles pour la synthèse des médicaments. Les molécules naturelles peuvent aussi être retouchées par l'homme pour être amélioré. La découverte de nouvelles propriétés pharmacologiques et l'extraction de nouveaux principes actifs (huiles essentielle, composés phénoliques, alcaloïdes, flavonoïdes, hétéroside). Contribuent au développent de la médecine par les plantes. Ces découvertes ont montré qu'ils avaient de nombreuses possibilités thérapeutiques dans le règne végétal.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes culinaires et médicinales en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études épidémiologiques ont fortement suggéré qu'une forte ingestion de produits végétaux est associée à une diminution significative du risque de nombreuses maladies chroniques telles que le diabète et certains types de cancers, l'athérosclérose, l'inflammation. Ces effets bénéfiques sont en partie attribués à des composés possédant une activité antioxydant. Les principaux antioxydants en particulier les composés phénoliques et les vitamines C et E et certains métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes et les terpènes (**Bohrom, 1997 ; Pascual et al., 1984 ; Fleuriet et al., 2005**).

L'Algérie possède une flore végétale diversifiée et riche. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal et largement distribué surtout dans les régions semi arides le genre *Punica*, de nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Punica granatum*. Cet arbre largement utilisée pour traiter

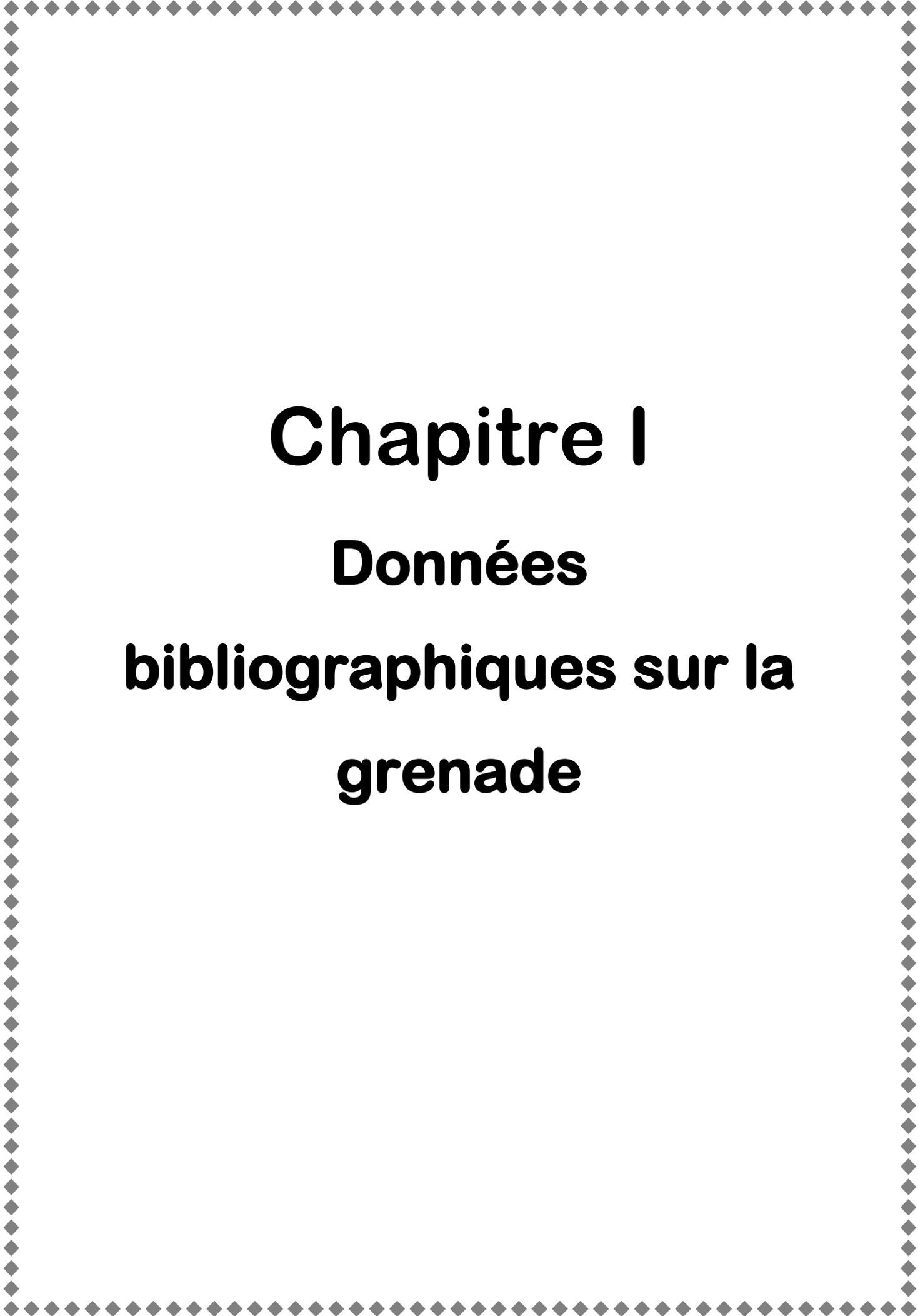
Introduction

les troubles digestives a constitué le sujet de plusieurs études qui ont déterminé leurs compositions chimiques ainsi que les propriétés biologiques (**Pascual et al., 1984 ; Fleuriet et al., 2005**) .

Les propriétés thérapeutiques potentielles du grenadier sont très variées et incluent traitement et prévention du cancer, diabète, les maladies cardiovasculaires, 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 antioxydant, anti-inflammatoire, anticarcinogénique et antimicrobienne antidiabétique du grenadier (**Ben Abdennebi, 2012**).

La peau épaisse et les cloisons internes de la grenade sont riches en tanins ce qu'il lui confère un goût âcre et amer. Les études ont montré que les antioxydants trouvés dans la grenade ont des effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire semblable aux effets du thé vert (*Sinensis Camélia*) (**Rosenblat et al., 2006**).

La peau de grenade (*Punica granatum* L.) est une partie non comestible obtenue pendant le traitement du jus de grenade. La peau de grenade est une source riche en composés phénoliques (**Lie et al., 2006**). Les propriétés antibactériennes et antioxydants de la peau de grenade dans les systèmes modèles in vitro ont été rapportées (**Negi et Jayaprakasha, 2003; Reddy et al., 2007; Alzoreky, 2009; Opara et al., 2009**).



Chapitre I
Données
bibliographiques sur la
grenade

1. Description botanique



Figure1 : Le grenadier. *Punica granatum*L

La grenade est un arbre à feuilles caduques dans les zones désertiques sèches et semi-caduques dans les zones côtières. La grenade a de nombreux crables cylindriques, flexibles, brunes et certaines branches latérales se transforment en épine courte. Habituellement, la hauteur de l'arbre atteint des mètres, allant de 4 à 5 mètres. Les branches tendent vers l'extérieur en raison du poids des fruits, car ils s'affaissent et pendent au sol.

1.1. Appareil végétatif

1.1.1. Les feuilles

La feuille de grenade est étroite, allongée, lisse et évasée sur les branches, brillante de la face supérieure. Il mesure de 3 à 7 cm de long et de 2 cm de large.

1.1.2. Les arilles

C'est la partie consommable du fruit. Cette baie renferme de nombreux grains contenus dans des loges, séparées par des cloisons tenues et membraneux (**Baritel, 1989**).

1.1.3. L'écorce du fruit

Environ 50% du poids total de la grenade correspond au péricarpe et l'albuginée, qui sont des sources importantes de composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitanins, les proanthocyanidines, l'azote, le calcium, le phosphore, le magnésium et le sodium (**Calin Sanchez et al., 2005**). Une excellente source de tous ces composés, s'ils sont épelés de la bonne manière (**Calin Sanchez et al., 2005**). Ecorce dure et assez épaisse (2-3mm) rouge vif à jaune chez certaines espèces (Collective international QA, 1996). Il est

riche en tanins hydrosolubles, principalement punicalagines , pédicellines (**Calin Sanchez et al.,2005**) .

L'écorce est riche en substances antibactériennes et antioxydants qui protègent le fruit des prédateurs et du rayonnement solaire.



Figure2 : L'écorce de grenade (**Calin Sanchez et al.,2005**)

1.2. Appareil reproducteur

1.2.1. Les fleurs

Le grenadier a des fleurs qui appellent balaustes (ont la forme de boutons), de couleur rouge pourpre ou grenat, portées par le court tige, d'aspect froissé (**Melgarejo et Salazar, 2003**).

Elles sont bisexuées, portant de 4 à 8 cm de pétales rouges et aussi pour sépales coriaces et juin-août.

-Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique (**Lanskye, 2007**).



Figure3 : Fleur de grenade (Yssad, 2019)

1.2.2. Les fruits

Les fruits de la grenade ont une forme ronde et contiennent de nombreux grains couverts de rouge à l'intérieur. il comprend des graines et la pule consommable, et ces grains sont séparés par une pule blanche non consommable.

1.2.3. Les grains

Les grains sont côtelés et leur coque externe est une fine couche gélatineuse remplie d'un liquide juteux dont la couleur varie du blanc au rouge foncé ou au rose selon la variété, car elle contient des sucres, des acides, des colorants et d'autres substances.



Figure4 : Grain de grenade (Yassad, 2019)

2. Nomenclature

le nom de cet arbre sera :

En arabe :الرمان.

En anglais :Pomegranate ou PomeGranate.

En allemand :Granatapfelbaum, Granatbaum, GemeineGranat, Balluster.

En espagnol :Granadocultivado, Mangrano.

En italien :Granato.

En chinois :Ngan Che Lieou, Shi Liu (**Reguieg, 2019**).

3. Classification botanique

Tableau1 : Position systématique de grenadier (**Spichiger, 2004**).

| | |
|---------------------------|-----------------|
| <i>Règne</i> | Plantae |
| <i>Embranchement</i> | Spermaphytes |
| <i>Sous-embranchement</i> | Angiospermes |
| <i>Classe</i> | Magnoliopsida |
| <i>Ordre</i> | Myrtales |
| <i>Ordre famille</i> | Punicaceae |
| <i>Genre</i> | Punica |
| <i>Espèce</i> | Punica granatum |

4. Habitat et répartition géographique

La culture de la grenade se répand et s'épanouit dans les régions subtropicales du monde entre les latitudes C41°N et C41°S, et les grenadiers peuvent pousser à de grandes hauteurs du niveau de la mer jusqu'à 2300m à mesure qu'ils poussent.

Dans certaines zones côtières, et chaudes, les arbres peuvent également supporter des températures basses, voire proches de zéro centile.

Chapitre 2

**Composition de la
grenade (phytochimie)**

1. Composés phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une activité carboxylique et un hydroxyle phénolique, contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales principalement dans la grenade qui contient de l'acide gallique et l'acide ellagique (**Psotová et al., 2003**).

2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, composés de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyranne, formant une structure C6-C3-C6 (**Kilani et al., 2005**). Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (**Häkkinen et al., 1999**).

3. Flavonols

Les flavonols (hydroxy-3 flavone) sont largement répandus et incolores, ils sont définis 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**).

4. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées à caractère alcalin d'origine végétale et présentent une structure moléculaire hétérocyclique complexe (**Badiaga, 2011**).

Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes racines, jeunes feuilles ; Puis, ils transferts ensuite aux différents lieux, peuvent subir des modifications. Ainsi, la nicotine produite dans les racines migre vers les feuilles aux diméthyles. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les graines ou les fruits, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (**Krief, 2003**).

5. Tanins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols qui se trouvent dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, grenade, datte, café, cacao...) localisés dans les vacuoles.

le terme « tanin » rassemble des composés poly phénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines.

Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation (Aguilera-Carbo *et al.*, 2008).

Il existe deux types de tanins :

5.1 Tanins hydrolysables

Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (O'connell et Fox, 2001).

5.2 Tanins condensés

Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères formés d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (O'connell et Fox, 2001).

Les tannins condensés sont trouvés dans la peau et le jus (Arjamand, 2011). La plupart des activités des tannins condensés dépendent en grande partie de leur structure, en particulier leur degré de polymérisation (Arapitsas, 2012).



Figure5 : Structure chimique d'un tanin hydrolysable et tanin condensé (Kumbasli,2005)

6. Anthocyanines

Ce sont des pigments vacuolaires violet, rouges, bleu, pourpres, mauves ou roses de la plupart des fleurs et des fruits (**Bruneton, 1993**).

La composition en anthocyanines est un paramètre important de qualité du fruit de la grenade, en pensée de l'importance de ces derniers dans la couleur des jus respectifs. Les anthocyanines dans la grenade changent considérablement avec les cultivars, maturité, le secteur de production et conditions saisonnières (**Gil et al., 1995 ; Borochoy-Neori et al., 2009**).

Chapitre III

**Activités biologiques et
utilisation de la grenade**

1. Les Activités biologiques de la grenade

1.1 .Activité anti-oxydante

Plusieurs auteurs (**Tezcan et al., 2009 ; Jacob et al., 2018**) ont été évaluée l'activité anti-oxydante in vitro de la grenade et de ses produits dérivés . La haute capacité anti-oxydante de la grenade et de ses produits dérivés est due à la présence des punica lagines dans sa composition et non pas aux anthocyanosides (**Tzulker et al., 2007**).

Parmar et Kar, (2008) ont démontré que l'extrait de la peau de grenade diminue la peroxydation lipidique dans les tissus hépatiques, cardiaques et rénaux et a un effet facilitant sur les capacités de piégeage de l'anion super oxyde et du peroxyde d'hydrogène.

Abdel Moneim (2012) a examiné l'extrait méthanolique de la peau de grenade pour son activité antioxydant sur le cerveau des rats mâles adultes albinos Wistar en mesurant les paramètres antioxydants (le glutathion réduit, la glutathion-S-transférase, la super oxyde dis mutase, la glutathion réductase, la catalase, et la glutathionperoxydase) la peroxydation lipidique (MDA), l'oxyde nitrique (NO) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), dans l'homogénat de cerveau. Le traitement avec la peau de grenade a eu comme conséquence l'augmentation marquée de la plupart des paramètres antioxydants avec la réduction des oxydants.

Les composés phénoliques de la grenade éprouvent une réaction redox étant donné que les groupes hydroxyles des molécules phénoliques fournissent de l'hydrogène aux agents réducteurs (**Madrigal-carballo et al., 2009**). Des études affirment que l'activité anti-oxydante des composés phénoliques est due à son habileté pour attraper les radicaux libres et les cations métalliques chélates (**Amarrowicz et al., 2004**).

(**Basu et al., 2009**) ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydant du thé vert en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux.

Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydant du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les moelles et les membranes du fruit (**Seeram et al., 2004**).

1.2. Activité Antimicrobienne

Selon **Neurath et al., (2004)**, les polyphénols de grenade ont des effets antimicrobiens intéressants et antiviraux. Le jus de grenade contient des inhibiteurs d'entrée HIV-1. L'étude de ce complexe montre qu'il bloque la liaison du virus avec certains récepteurs cellulaires.

Prashanth et al., (2001) ont étudié in vitro, l'action de différents extraits d'écorces de grenade (péricarpe) sur six espèces bactériennes : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli*. Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Néanmoins, l'extrait méthanolique semble posséder une activité antibactérienne plus importante que l'autre extrait, essentiellement sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*.

Haidari et al., (2009) ont mené une étude en utilisant des extraits polyphénoliques de grenade. Ils ont démontré que ces extraits ont une action anti-influenza et que le punicalagin (tanin hydrolysable spécifique de la grenade) a un effet virucide et inhibiteur de la réplication de l'ARN viral.

Braga et al., (2005) ont suggéré que les extraits de grenade ont pu être considérés comme une thérapie antibactérienne potentielle avec la capacité additionnelle d'inhiber la production d'entérotoxine. Ils ont ajouté que les propriétés antibiotiques de l'extrait sont d'un intérêt extrême à la suite de la menace croissante des souches bactériennes développant une résistance aux antibiotiques conventionnels.

L'extrait méthanolique à 80% des peaux de grenade est un inhibiteur efficace contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Yersinia enterocolitica* (**Al-Zoreky., 2009**).

Neurath et al., (2004) ont analysé l'action de différents jus de fruits, et plus particulièrement le jus de grenade, sur la reconnaissance et l'entrée dans la cellule hôte de différents sous-types de VIH-1. Les résultats de cette étude montrent que le jus de grenade adsorbé sur de l'amidon de maïs permet de bloquer la fixation du virus sur ses cellules cibles.

1.3. Activité Anti-inflammatoire

Il y a de nombreuses preuves scientifiques qui démontrent clairement la propriété anti inflammatoire de la grenade et de ses produits dérivés. Selon **Tomas-barberan, (2010)** Certains extraits de la grenade, notamment les pépins presses a froid, inhibent l'action des enzymes cyclo oxygénases et lipo oxygénases in vitro. La cyclo-oxygénases est une enzyme très importante pour la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, qui sont des médiateurs importants de l'inflammation. La lipo-oxygenase conduit a la transformation de l'acide arachidonique en Leucotriènes.

Lee et al., (2010) ont analysé quatre tanins hydrosolubles isolées de la grenade, dont la punicaline et la punicalagine. Chacun de ces composés à différentes doses, produit une inhibition spécifique de la production de monoxyde d'azote. De plus, **Larosa et al., (2010)** ont démontré que l'activité anti- inflammatoire de la grenade et due également à la présence d'acide ellagique qui contribue a la diminution des niveaux de prostaglandines.

1.4. Activité anticancéreuse

Selon **Aiche et al., (2016)** le cancer décrire le phénomène de croissance cellulaire sans contrôle. De nombreux facteurs contribuent à son développement. Les ROS représentent un facteur causal dans le développement du cancer. Des dommages importants aux ROS de l'ADN conduisent finalement à des tumeurs des organes et des mutations somatiques.

Lansky et al., (2005) ont démontré que le tanin, la flavone œstrogénique, l'acide ellagique, l'acide caféique, l'acide phénolique, la lutéoline et l'acide gras triénoïque conjugué, l'acide punique, sont des composés à action anticancéreuse connus trouvés en quantités substantielles dans les pelures, le jus et l'huile de graines fruit de grenade .

Selon **Ismail et al., (2012)**, l'extrait de la peau de grenade réduit le risque de cancer de la peau en inhibant la prolifération des mélanocytes et la synthèse de mélanine. Plusieurs études ont confirmé la capacité des ellagitannins (500–10 000 mg /l) de EPG à inhiber la génération de radicaux libres dans la peau humaine irradiée aux UVA et UVB, ainsi la protéger de la fragmentation de l'ADN, les brûlures cutanées et la dépigmentation. Dans des études antérieures, l'application d'EPG et la génistéine (isoflavone) présentent une inhibition significative plus élevée de cellules MCF-7, et des effets cytotoxiques dans le traitement des cellules cancéreuses du sein, en outre, l'EPG a montré le potentiel d'inhibition de l'expression du gène rapporteur dépendant du facteur nucléaire kappa B (NFkB) associée à la prolifération, l'invasion et la motilité dans les phénotypes agressifs du cancer du sein .

2. Utilisation de *Punica granatum*, L.

2.1. Utilisation en agroalimentaire

Benyahia et al., (2016) ont montré que l'extrait de la poudre de la peau de grenade (EPPG) peut être utilisé comme conservateur naturel dans les produits carnés. L'extrait méthanolique de la peau de grenade améliore la stabilité oxydative de l'huile de tournesol, à différentes concentrations.

Les résultats une étude a porté sur la formulation d'un jus et d'une gelée de jus de grenade additionné d'un extrait de l'écorce montrent que l'additionnée de l'extrait de l'écorce présente des propriétés rhéologiques similaires à celles des gelées commerciales. Ainsi, un jus de grenade moins sucré, pauvre en calories a été fabriqué, par l'ajout de l'extrait de l'écorce de grenade, ce jus est riche en antioxydants tout au long de la période de conservation (08 semaines) .

2.2. Utilisation industrielle

2.2.1. Le tannage et la teinture

Le grenadier fournissait, grâce à l'écorce de ses fruits dans les années 1950, une matière tannante, sans emploi dans les industries européennes, mais très utilisée dans le nord de l'Afrique pour la préparation des maroquins jaunes. L'écorce de grenade servait au tannage et à la teinture des cuirs, ainsi, il était employé, avec mordantage à l'alun, pour donner leur belle couleur jaune aux cuirs marocains, utilisés par exemple pour la réalisation des babouches. L'industrie européenne de l'impression des tissus, au XIXème siècle, a intégré l'écorce de grenade et la racine de grenadier dans la vaste gamme des teintures naturelles (**Wald, 2009**).

Le grenadier fournit de nombreux principes tinctoriaux, aux couleurs très variées tels que le vert, bruns et noirs, une large palette de jaunes, des gris. L'écorce du fruit et les fleurs sont utilisées pour teindre le textile (**Wald, 2009**) .

Selon **Benmeziane et al., (2012)** les substances colorantes issues du grenadier sont utilisées de façon traditionnelle dans plusieurs pays pour la teinture des tapis.

2.2.2. L'encre

Selon **Wald, (2009)**, l'écorce de la grenade fut quelques fois utilisée pour remplacer la noix de galle, dans la préparation de l'encre.

2.2.3. Utilisation dans la médecine traditionnelle

Dans la médecine traditionnelle toutes les parties de grenade, fruits, pépins, racines, écorce, sont utilisées pour traiter maladies. L'écorce du fruit est utilisée par de nombreux peuples contre les diarrhées, les ulcères, les parodontoses, les stomatites et les pharyngites (**Benmeziane et al., 2012**) .

Selon **Bakhtaoui et al., (2019)** les fleurs séchées sont utilisées pour guérir les bronchites et les inflammations buccales aussi démontrant que la plus célèbre utilisation dans le monde a été celle d'un vermifuge, tueur et expulseur des vers intestinaux. En effet, les alcaloïdes contenus dans les racines, l'écorce de l'arbre et l'écorce du fruit induisent le relâchement du ténia et de son emprise sur la paroi intestinale, ce qui facilite son expulsion.

Chapitre IV

**Données
bibliographiques sur
Staphylococcus aureus
et *Pseudomonas
aeruginosa***

1. *Staphylococcus aureus*

1.1. Caractéristiques

S. aureus est un cocci à Gram positif, c'est une bactérie pyogène et toxigène, responsable de nombreuses infections communautaires et nosocomiales qui représente donc un problème de santé publique important. Elle provoque de nombreuses infections dues à la multiplication de la bactérie et des infections toxiques liées à la diffusion de toxines spécifiques. Typiquement elle se présente sous forme de coques sphériques de diamètre 1 µm, et se trouve généralement dans les fosses nasales et sur la peau de personnes en bonne santé. Si elle pénètre dans le corps, elle peut causer des infections cutanées légères, telles que des furoncles ou des anthrax, ou des infections plus graves, comme des pneumonies ou des bactériémies (Mungkalasiri, 2009).

Les *Staphylococcus aureus* sont communément appelés staphylocoques dorés à cause des pigments caroténoïdes jaunes qu'ils produisent. Ils causent des infections chroniques graves. Ces infections peuvent aller de l'intoxication alimentaire sévère à la formation d'abcès disséminés sur tout le corps. Les staphylocoques peuvent donc causer des maladies dans presque tous les organes ou tissus du corps. Ils peuvent se répandre par les mains, le système respiratoire, la peau. On trouve généralement les staphylococcies chez les personnes au système immunitaire affaibli (Mungkalasiri, 2009).

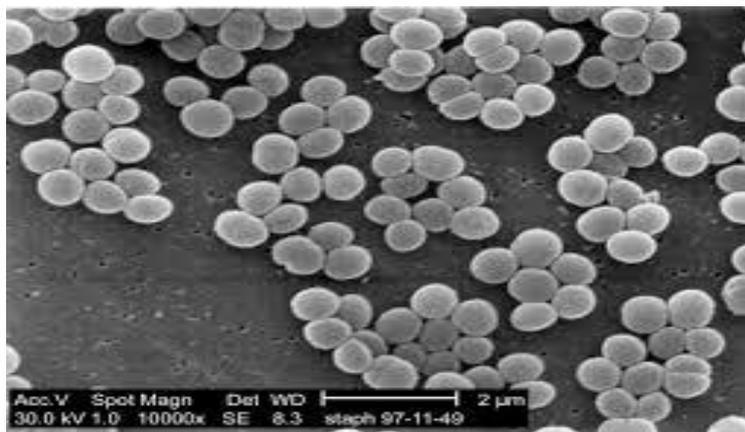


Figure 6 : Image MEB de *Staphylococcus aureus* (Mungkalasiri, 2009)

1.2. Taxonomie

Tableau2 : Classification de *S. aureus* (Belkacem, 2017)

| | |
|----------------|------------------------------|
| Règne | <i>Bacteria</i> |
| Phylum | <i>Firmicutes</i> |
| Classe | <i>Bacilli</i> |
| Ordre | <i>Bacillales</i> |
| Famille | <i>Staphylococcaceae</i> |
| Genre | <i>Staphylococcus</i> |
| Espèce | <i>Staphylococcus aureus</i> |

2. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1 Caractéristiques

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram (-), aérobie ubiquiste considérée comme pathogène opportuniste. Sa résistance supérieure aux autres bactéries vis-à-vis de certains des infectants peut conduire à sa présence lors d'infections en milieu hospitalier. Elle conduit à des surinfections graves (Prenom,2001).

P. aeruginosa est capable d'infecter un large spectre d'hôte : humains, souris, plantes, insectes, nématodes, cette bactérie affecte particulièrement les personnes immunodéprimées, les grands brûlés et les patients en soins intensifs. A l'hôpital, elle est responsable de 16 % des infections pulmonaires, de 12% des infections du tractus urinaires, de 8% des infections touchant les grands brûlés et de 10% des infections du sang (bactériémie et/ou septicémie). Cette bactérie est également une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose Ces patients développent une infection pulmonaire chronique qui conduit à une destruction des tissus pulmonaires par les toxines bactériennes (Rossignol, 2007).

Chapitre 4 Données bibliographiques sur staphylococcus et pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa colonise les poumons et s'installe rapidement sous forme de bio film, ce qui lui permet de résister aux défenses immunitaires de l'hôte et aux antibiotiques (Rossignol, 2007).

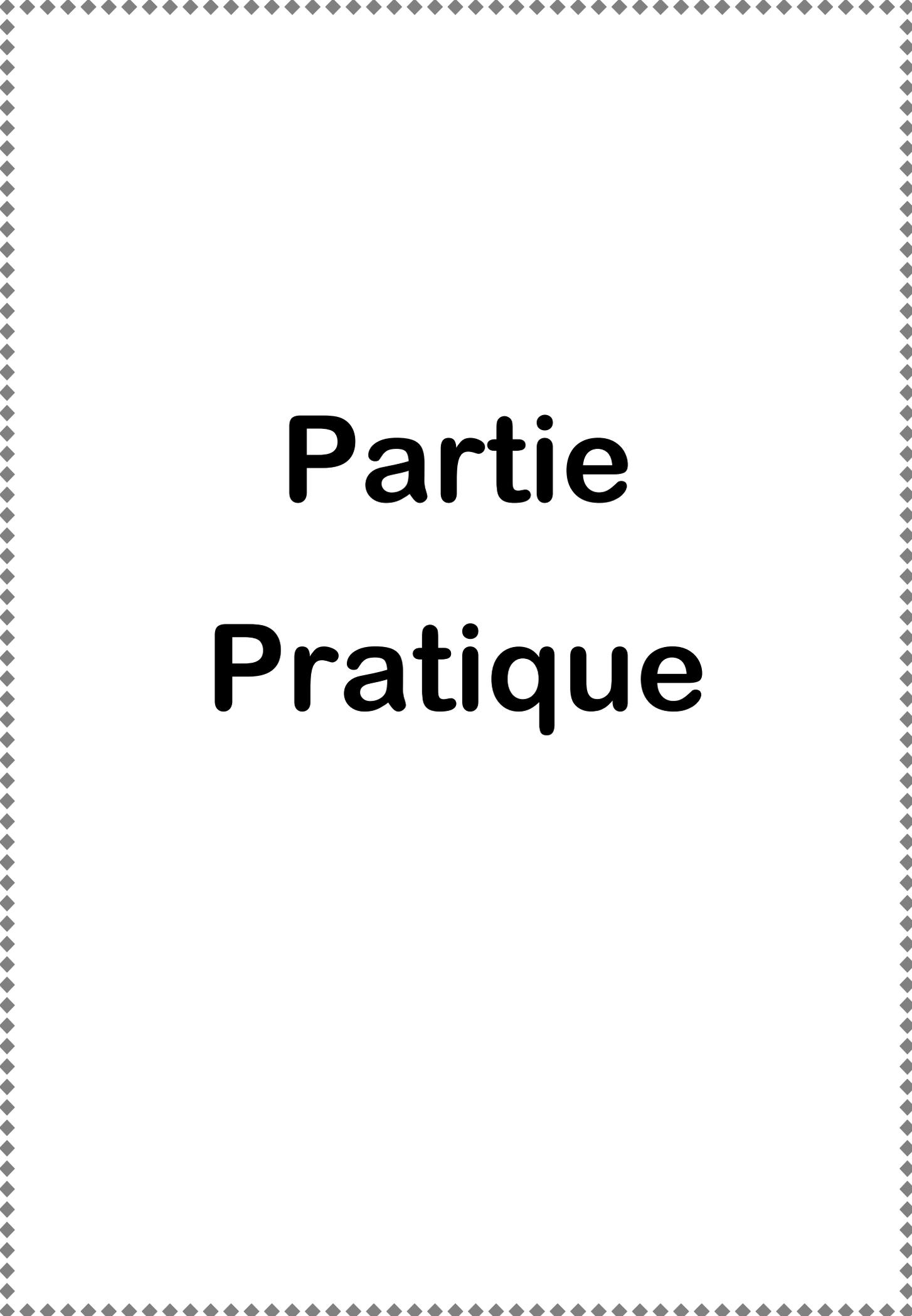


Figure7 :*Pseudomonas aeruginosa*

2.2. Taxonomie

Tableau3 : Classification de *P. aeruginosa* (Mderreg ,2015)

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Règne | Bacteria |
| Embranchement | Prokaryota |
| Division | Proteobacteria |
| Classe | Gammaproteobacteria |
| Ordre | <i>Pseudomonadales</i> |
| Famille | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Genre | <i>Pseudomanas</i> |
| Espèce | <i>Aeruginosa</i> |



Partie Pratique

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET

MÉTHODES

1. Objectif

Ce travail expérimental consiste à évaluer l'effet antimicrobien des extraits de Grenade (*Punica granatum*) sur deux germes pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'extrait de grenade a été obtenu en utilisant comme solvants d'extraction l'éthanol et l'eau distillée.

2. Lieu de l'étude

Cette présente étude a été réalisée au laboratoire de Microbiologie 7 et 8 de la Faculté de SNV de l'Université Ahmed El Wancharissi de Tissemsilt.

3. Matériel de laboratoire

Burette, Tubes à essai, Agitateur, Balance électronique, Spatule, Mortier et Pilon, Spectrophotomètre, Erlenmeyer, Entonnoir, Papier filtres, Flacons en verre, Bêchers, Boite de pétri, Micropipette, Pince, Bec bunsen, Des écouvillons, Seringue, Pipettes pasteur.

4. Matériel végétal

4.1. La récolte de la plante

Les fruits de grenade sont récoltés dans la région de Mouzaia wilaya de Blida, cueillies de façon aléatoire vers la fin du mois Octobre.

4.2. Séchage

La matière végétale a été ensuite séchée à l'air libre et à l'ombre.

4.3. Broyage

A l'aide d'un mortier et d'un pilon, les écorces grenade séchées ont été broyé jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et ce dans le but de diminuer la taille de la matière végétale et d'augmenter ainsi la surface de contact solvant-échantillon.



Figure8 : L'écorce avant et après le broyage(**Originale**)

Le 19/03/2023

4.4. Conservation

Jusqu'au moment de préparation des extraits, la poudre obtenue a été conservée dans un flacon en verre à l'abri de la lumière.

5. Matériel biologique microbien

Tableau4 : Liste des souches microbiennes testées

| Souche | Code | Gram | Source |
|-------------------------------|------------|---------|--------------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | Négatif | Institut Pasteur d'Alger |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 | Positif | |

6. Antibiotiques testés

Tableau5 : Liste des antibiotiques

| Sigle | Antibiotiques | Charge du disque en µg |
|-------|---------------|------------------------|
| FF | Fosfomycine | 50 |
| TC | Ticarcilline | 75 |
| VA | Vancomycine | 30 |
| LEV | Lévofloxacine | 5 |
| PRL | Pipéracilline | 30 |
| P | Pénicilline | 10 |

6. Extraction des composés phénoliques

C'est une technique qui sépare les matériaux naturels ou les matériaux composites des matières premières à l'aide de solvants. Si le matériau à séparer est un liquide, on parle d'extraction liquide, liquide, mais s'il est solide, on parle d'extraction solide, liquide.

6.1. Extraction aqueuse

20 g de poudre d'écorce de grenade a été macérée avec 200 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 1Litre pendant 6 heures, sous agitation douce, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le mélange est ensuite filtré sur papier Wattman de 0,2 µm avec utilisation d'une pompe à vide.

Le filtrat est récupéré dans un flacon stérilisé et conservé à 4°C, à l'abri de la lumière jusqu'au moment de son utilisation.



Broyage



Macération



Le filtrat



Filtration

Figure 9 : Les étapes de l'extraction aqueuse d'écorce de grenade(Originale).

Le 27/03/2023

6.2. Extraction Hydro-éthanolique

20 g de poudre d'écorce de grenade ont été additionné au mélange d'une solution hydro-éthanolique (160ml éthanol + 40ml d'eau distillée) dans un erlenmeyer de 1Litre pendant 6 heures sous agitation douce, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le mélange est ensuite filtré sur papier Wattman de 0,2 μm avec utilisation d'une pompe à vide. Le filtrat a été soumis à une évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapeur à 45°C jusqu'à épuisement et récupérer le résidu de l'éthanol.

Le filtrat est récupéré dans un flacon stérilisé et conservé à 4°C, à l'abri de la lumière jusqu'au moment de son utilisation.

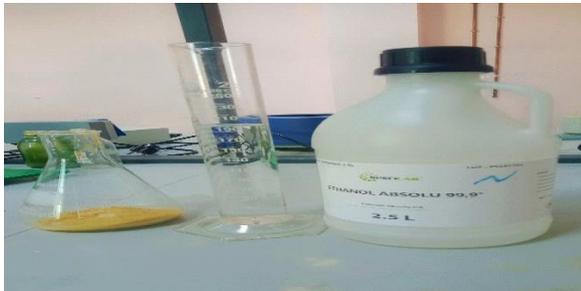


Figure10 :Les composants pour préparer un extrait(Originale) Le 27/03/2023



Figure11 :Macération sous agitation magnétique(Originale) Le 27/03/2023

6.2.1. Evaporation

Elle est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor) à une température comprise de 45°C, afin obtenir un extrait éthanolique brut.



Figure12 : Evaporation de l'extrait éthanolique (Originale).
Le 28/03/2023

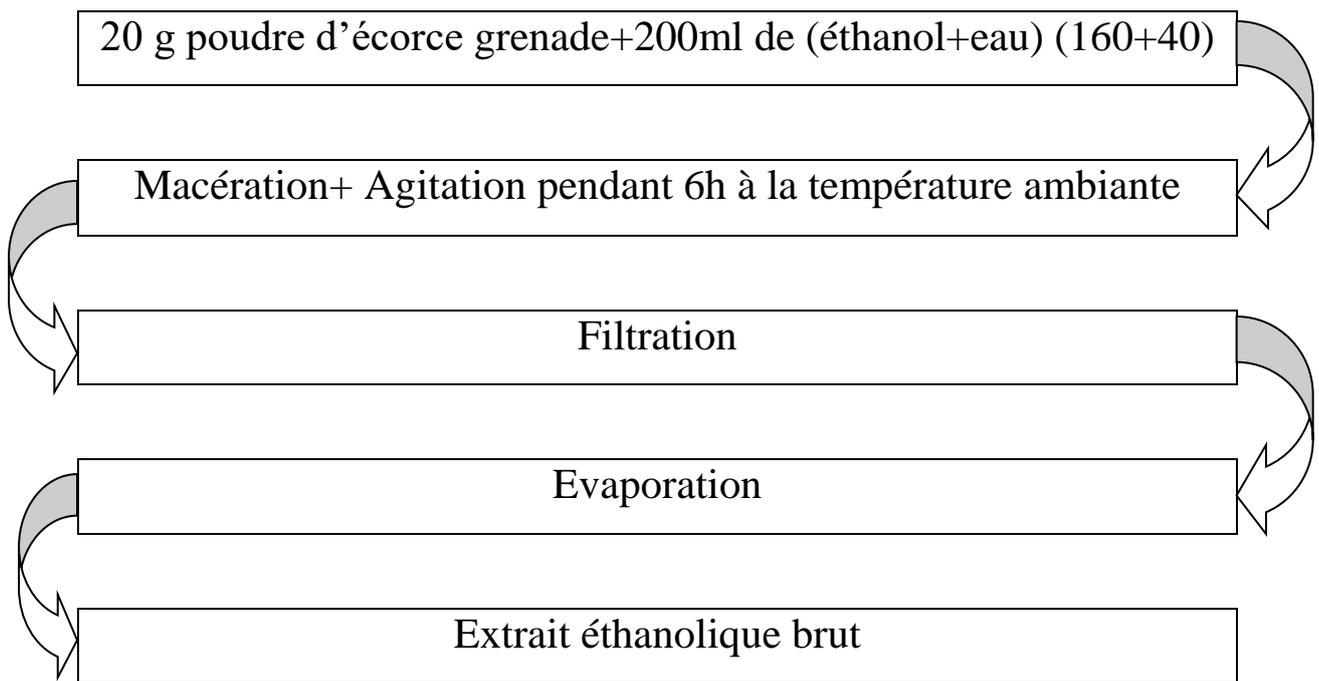


Figure13 : Protocole de préparation d'extrait éthanologique par macération

7. Préparation des différentes solutions expérimentales

A partir des différents extraits de *Punica granatum* (extrait aqueux et extrait hydro-éthanolique) obtenus, des solutions diluées à l'eau distillée à raison de 0, 20, 40, 60,80 et 100% ont été préparées.



Figure14 : Préparation des différentes dilutions de solution hydro-éthanolique (Originale) Le 29/03/2023.



Figure 15:Préparation des différentes dilutions de solutions aqueux (Originale) Le 29/03L2023.

8. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits étudiés

8.1 Préparation des milieux de culture

Dans des boites de pétri stériles de 90 mm de diamètre et sur une épaisseur de de 4mm d'épaisseur on fait couler la gélose Muller Hinton stérile prête à l'usage, afin qu'elles soient uniformément réparties sur toute la surface des boites.

8.2 Activation des souches bactériennes

Pour préparer une suspension bactérienne:

Dans 02 tubes à essais on ensemence chaque souche (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) avec 10ml de bouillon nutritif, incubation à 24h/37C° (**Gachkar et al., 2007**).

Remarque : Une pré-culture de souche microbienne est réalisée afin d'atteindre la phase exponentielle de croissance. La turbidité est ensuite ajustée au standard 0,5 Mc Farland avec un spectrophotomètre (longueur d'onde $\lambda=625\text{nm}$, DO=0,08 à 0,1), ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml.



Figure16 : Spectrophotomètre (Originale) Le 28/03/2023 .

8.3. Méthode de diffusion sur milieu gélosé

8.3.1. Culture des bactéries

L'ensemencement est effectué sur le milieu MH séché grâce à un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne de 24h d'incubation, qu'on frotte sur la totalité de la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence les boites de pétri avec les souches expérimentées.



Figure17 : Préparation des boîtes de pétri
(Originale) Le 29/03/2023.



Figure18 : Ensemencement sur GN
(Originale) Le29/03/2023.

8.3.2. Dépôt des extraits

Chaque disque en papier wattman est déposé au centre des boîtes de pétri coulé avec la gélose MH, puis à l'aide d'une micropipette, une quantité (100µl) de chaque dilution d'extrait est versée sur les disques.



Figure19 : Application des disques
(Originale) Le 29/03/2023.

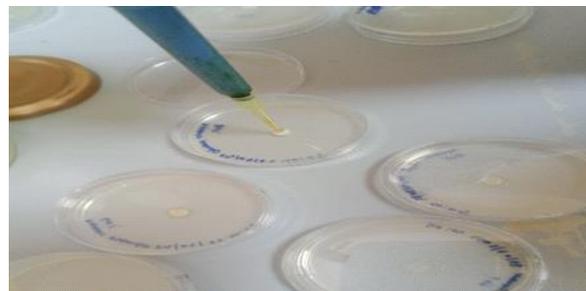


Figure20: Dépôt de l'extrait sur les disques
(Originale) Le 29/03/2023.

8.3.3. La conservation des boîtes de pétri

Toutes les boîtes ont été laissées pendant 15 min à température ambiante pour permettre la diffusion des extraits, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

8.3.4. Lecture des résultats

L'apparition d'une zone circulaire transparente autour des disques sous l'effet de l'extrait testé montre l'absence de la croissance bactérienne. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible. Les diamètres des zones d'inhibition développés autour des disques ont été mesurés.



Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

1. Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits

1.1. Extrait aqueux

| Dilutions | Souches | |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 20% | 0 | 0 |
| 40% | 0 | 0 |
| 60% | 0 | 0 |
| 80% | 10 | 0 |
| 100% | 12 | 0 |
| T | 0 | 0 |

Tableau 6: Résultats de l'aromatogramme des extraits aqueux exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm)

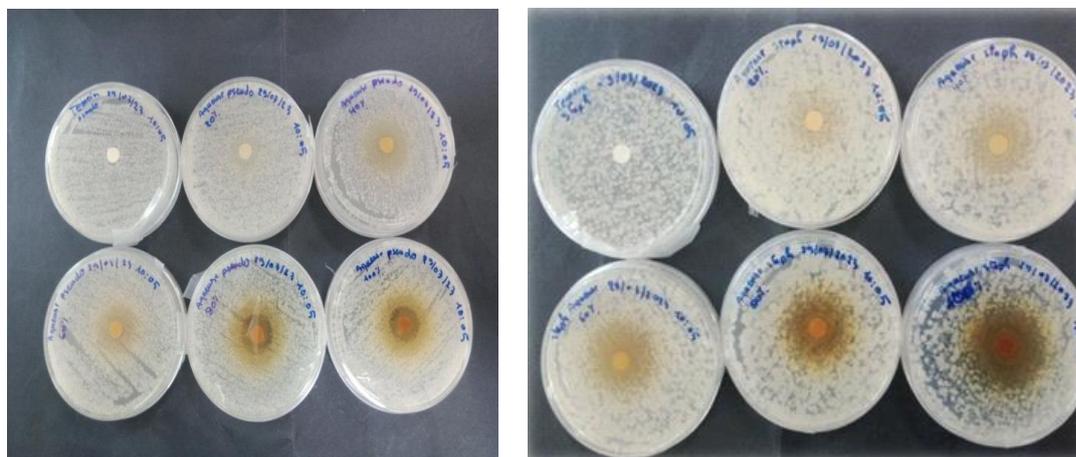


Figure21: Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de grenade sur les deux souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Résultats et Discussion

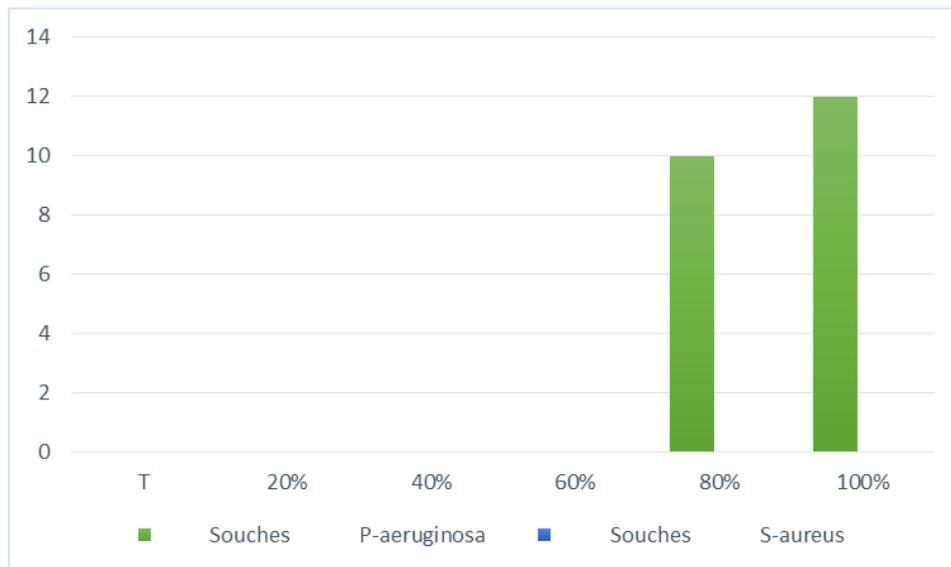


Figure 22 : Histogramme présentant les diamètres d'inhibition de l'extrait aqueux de *Punica granatum* sur les deux souches testés *S.aureus* et *P.aeruginosa*

A travers les résultats obtenus (tableau 6 et la figure 22), on constate que l'extrait aqueux a atteint des diamètres d'inhibition significatifs pour la souche *P. aeruginosa*, contrairement à la souche *S. aureus*, où aucun diamètre d'inhibition n'a été obtenu. Les diamètres d'inhibition les plus élevés ont été notés à des concentrations de 100% et 80% pour *P. aeruginosa* soient des diamètres de l'ordre de 12 et 10 mm respectivement, et ce contrairement aux concentrations de 20%, 40% et 60%, où aucune inhibition n'a été enregistré.

A partir de ce constat, on déduit que *P. aeruginosa* est plus sensible à l'action de l'extrait aqueux de L'écorce de *Punica granatum* aux concentrations de 100 et 80 %.

Résultats et Discussion

1.2. L'extrait hydro-éthanolique

| Dilutions | Souches | |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 20% | 8 | 0 |
| 40% | 11 | 0 |
| 60% | 15 | 0 |
| 80% | 16 | 0 |
| 100% | 17 | 0 |
| T | 0 | 0 |

Tableau7 : Résultats de l'aromatogramme des extraits hydro-éthanoliques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm)

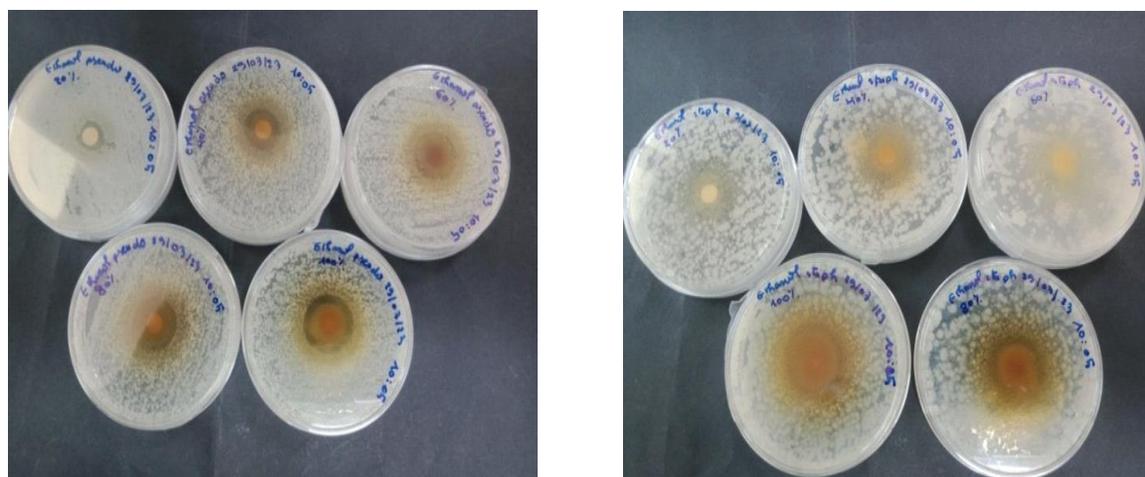


Figure23 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydro-éthanolique de l'écorce de grenade sur les deux souches testées *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Résultats et Discussion

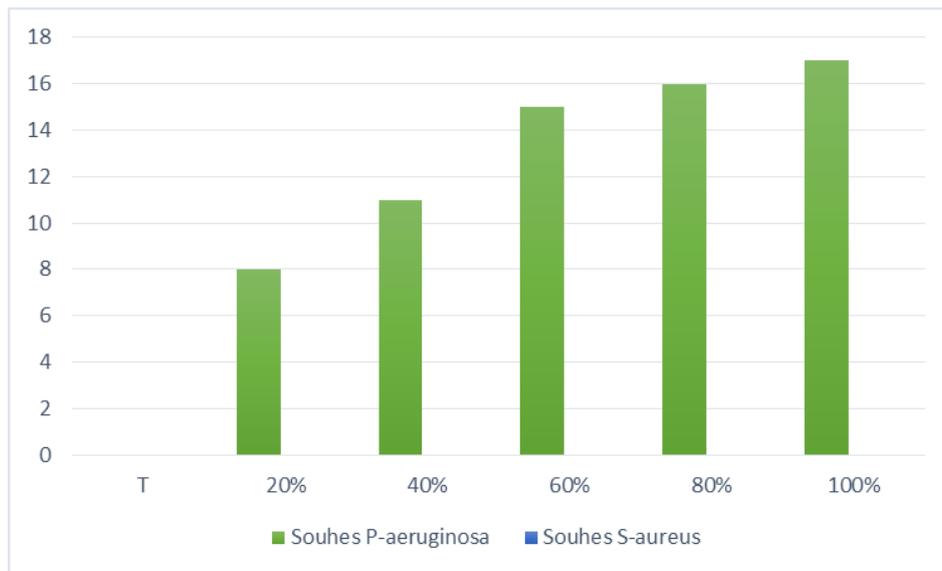


Figure 24 : Histogramme présentant les diamètres d'inhibition de l'extrait hydro-éthanolique de *Punica granatum* sur les deux souches *S.aureus* et *P.aeruginosa*

Les résultats de l'effet de l'extrait hydro-éthanolique (tableau7, figure24) montre des inhibitions plus importantes obtenues chez *P. aeruginosa* que celles enregistrées avec l'extrait aqueux. Les diamètres des zones d'inhibition enregistrées sont de l'ordre de 17, 16, 15, 11 et 8 mm pour les concentrations respectives de 100, 80, 60, 40 et 20%. En revanche, aucune inhibition n'a été obtenue pour la souche *S. aureus* quel que soit la concentration testée.

1.3. Résultats de l'antibiogramme

Tableau8 : Résultats de l'antibiotique exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm)

| Antibiotique | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|---------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Fosfomycine (FF) | 32 | 0 |
| Ticarcilline (TC) | 13 | 31 |
| Vancomycine (VA) | 21 | 25 |
| Lévofloxacine (LEV) | 30 | 39 |
| Pipéracilline (PRL) | 29 | 29 |
| Pénicilline (P) | 0 | 27 |

Résultats et Discussion

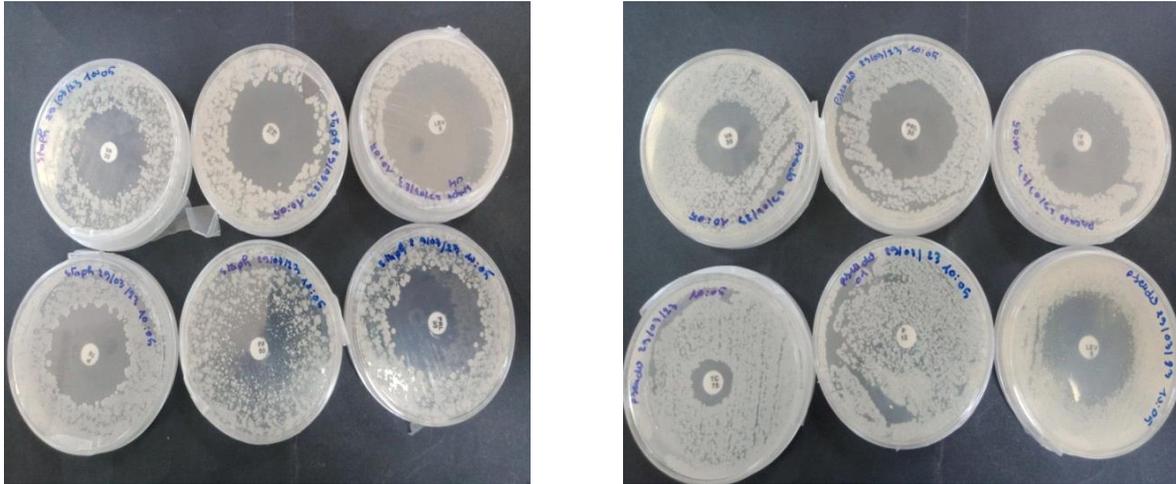


Figure 25 : Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotique sur les deux souches testées *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

A travers les résultats des antibiogrammes (tableau8, figure25), on remarque que des inhibitions importantes ont été obtenues pour les 02 souches testées. Les diamètres d'inhibition de *P. aeruginosa* ont atteint des valeurs de l'ordre de 32 mm pour la Fosfomycine, 30 mm pour la Lévofoxacine, 29 mm pour la Pipéracilline, 21 mm pour la Vancomycine. Par ailleurs une nette résistance a été notée vis-à-vis de la pénicilline soit 0 mm de diamètre.

Concernant la souche *S. aureus*, de fortes inhibitions ont été notées vis-à-vis la Lévofoxacine (39 mm), 31 mm pour la Ticarcilline, 29 mm pour la Pipéracilline, 27 pour la Pénicilline et 25 pour la Vancomycine. En revanche, *S aureus* est résistante à la Fosfomycine.

Résultats et Discussion

2. Discussion

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne des extraits sur les deux bactéries (*S.aureus* et *P.aeruginosa*) a été faite par la méthode des aromatogrammes, une méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé MH. Le pouvoir antimicrobien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al., (2009)**.

Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en 4 classes :

<10 mm Résistant (non sensible) ;

10 à 14mm Sensible ;

15 à 20mm Très sensible ;

>20mm Extrêmement sensible

Les deux extraits (EHET-EA) de *Punica granatum* contiennent bien des composés bioactifs antimicrobiens ayant exercés un effet inhibiteur sur la croissance de *P.aeruginosa*.

Les zones d'inhibition calculées nous ont permis de classer la souche de *P. aeruginosa* dans la catégorie sensible, contrairement à la souche *S. aureus* qui s'est montrée résistante.

Selon **Reddy et al., (2007)**, différents extraits de grenade dans différents solvants présentent une activité antimicrobienne significative contre *Cryptococcus neoformans*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *S. aureus*.

Par ailleurs, **Al-Zoreky, (2009)** a démontré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* et *Yersinia enterocolitica*.

L'étude réalisée par **Ahmed, (2013)** et ses collaborateurs sur différentes concentrations d'extrait d'écorce de grenade (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 mg / ml), a montré une sensibilité importante de *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaricus*, *Candida albicans* et *Candida tropicalis* à partir des concentrations de 0,3 mg / ml.

Dans une autre étude, **Reguieg Ysaad et Hammadi, (2017)** ont constaté que tous les extraits de grenade (extrait aqueux, éthanolique et méthanolique) à une concentration de 0,1 g/ml,

Résultats et Discussion

présentaient une activité antibactérienne élevée sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Selon **Reddy et al., (2007)**. Les fractions de l'acide ellagique, de l'acide gallagique, des punicallines, et des punicalagines extraits à partir de la grenade ont révélé une activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* méthicilline-résistant.

D'après **Rojas et al., (1992)** Les plantes contiennent un groupe de composés qui exercent un effet antimicrobien, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les huiles essentielles, les flavonoïdes. Selon **Ben Sassi et al., (2007)** **Naili et al., (2010)**, le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques.

La principale cible de ces composés bioactifs naturels est la membrane bactérienne, ainsi l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les alcaloïdes, flavonoïdes voir même les tanins pourraient induire une fuite des ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquence des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (**Rhayour, 2002**).

Par ailleurs, Selon **Balentine et al., (2006)** la sensibilité des souches Gram- (*Pseudomonas aeruginosa*) est due à la présence d'une fine couche de peptidoglycane perméable aux alcools y compris l'éthanol présent dans notre extrait. Cependant pour les Gram+ (*Staphylococcus aureus*) la présence d'une paroi épaisse de peptidoglycane empêche la pénétration de substances antibactériennes solubilisées dans l'éthanol.

L'hypersensibilité de la souche Gram+ peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries aux changements environnementaux externes tels que la température, le pH et les extraits naturels, dû à l'absence de la membrane externe (**Balentine, 2006**).

De plus Il ne faut pas oublier que le produit actif qui se présente dans la plante peut être soit actif sans être métabolisé et aura ainsi une activité *in vitro* et *in vivo*, soit actif après métabolisation et dans ce cas il sera inactif *in vitro* et actif *in vivo* (**Chaouche, 2014**).

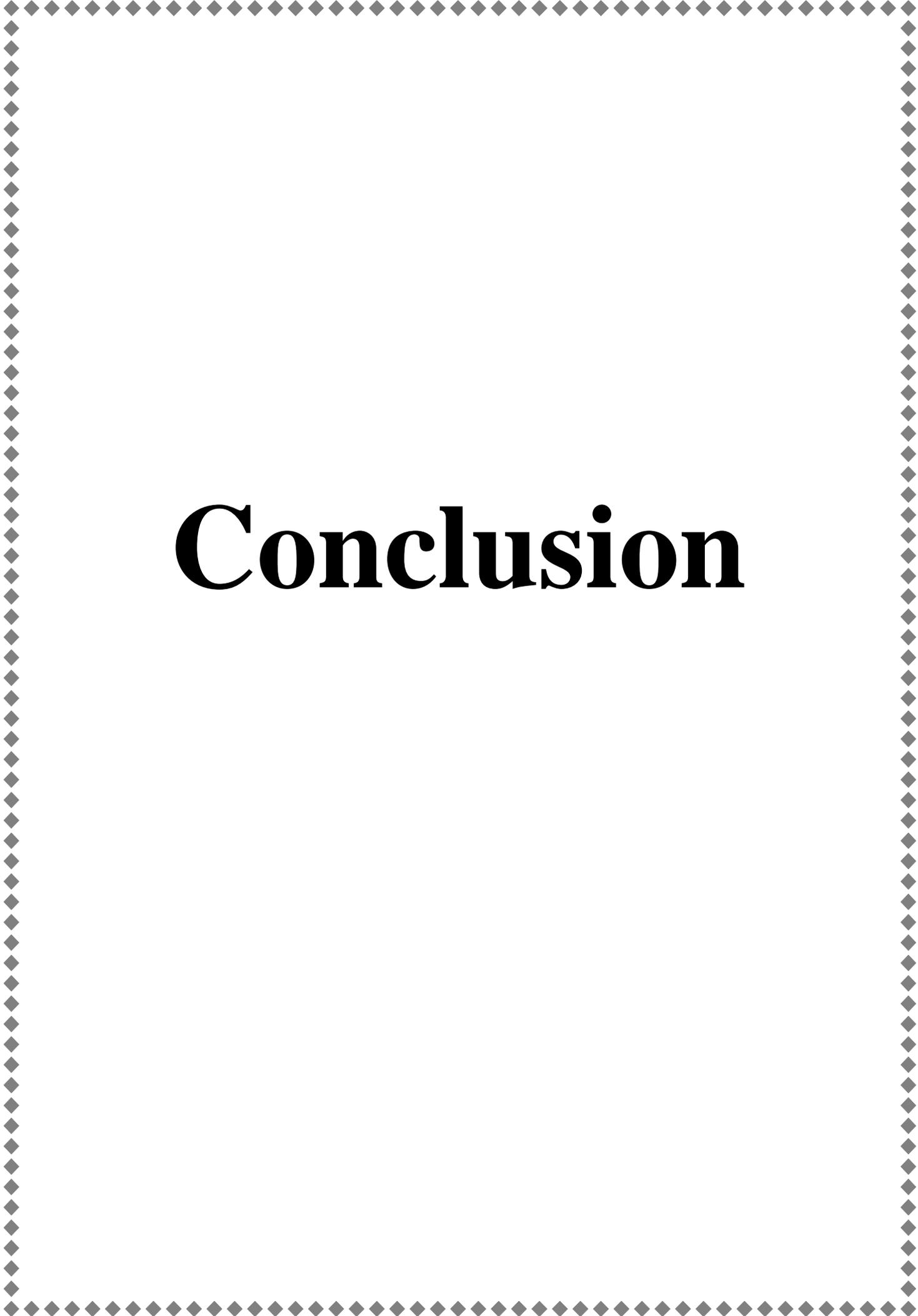
Résultats et Discussion

Aussi selon **Boudjouref, (2011)**, la variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leur composition chimique. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

Sari et al., (2006) ont démontré que l'activité antimicrobienne est dépendante des souches employées et des caractères physico-chimiques des composés phytobiotiques.

D'autre par Les facteurs climatiques (l'humidité relative, le régime des vents, la température, de lumière, l'alternance de chaleur, etc...) exercent une influence chez les végétaux. L'influence du sol ou facteur édaphique est aussi très grande. Les propriétés physiques du sol (porosité, rétention d'eau...), sa nature (argileuse, sablonneuse...) et sa composition (teneur en azote, terrains calcaires, siliceux...) sont des facteurs déterminants pour la végétation, ce qui fait que la composition chimique d'une plante d'une même espèce varie selon la zone géographique, ce que pourrait expliquer la divergence de résultats (**Gülçin et al., 2003**).

De plus **Dethier, (1996)** a montré que la façon de mener les extractions (nombre de lavages, broyages de la matière végétale, temps des opérations) peuvent jouer sur la composition et les caractéristiques organoleptiques de l'extrait. L'activité des principes actifs serait liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante (**Moussaid et al., 2012**).



Conclusion

Conclusion

Aujourd'hui, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales ont des propriétés biologiques très importantes avec de nombreuses applications dans divers domaines, à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture.

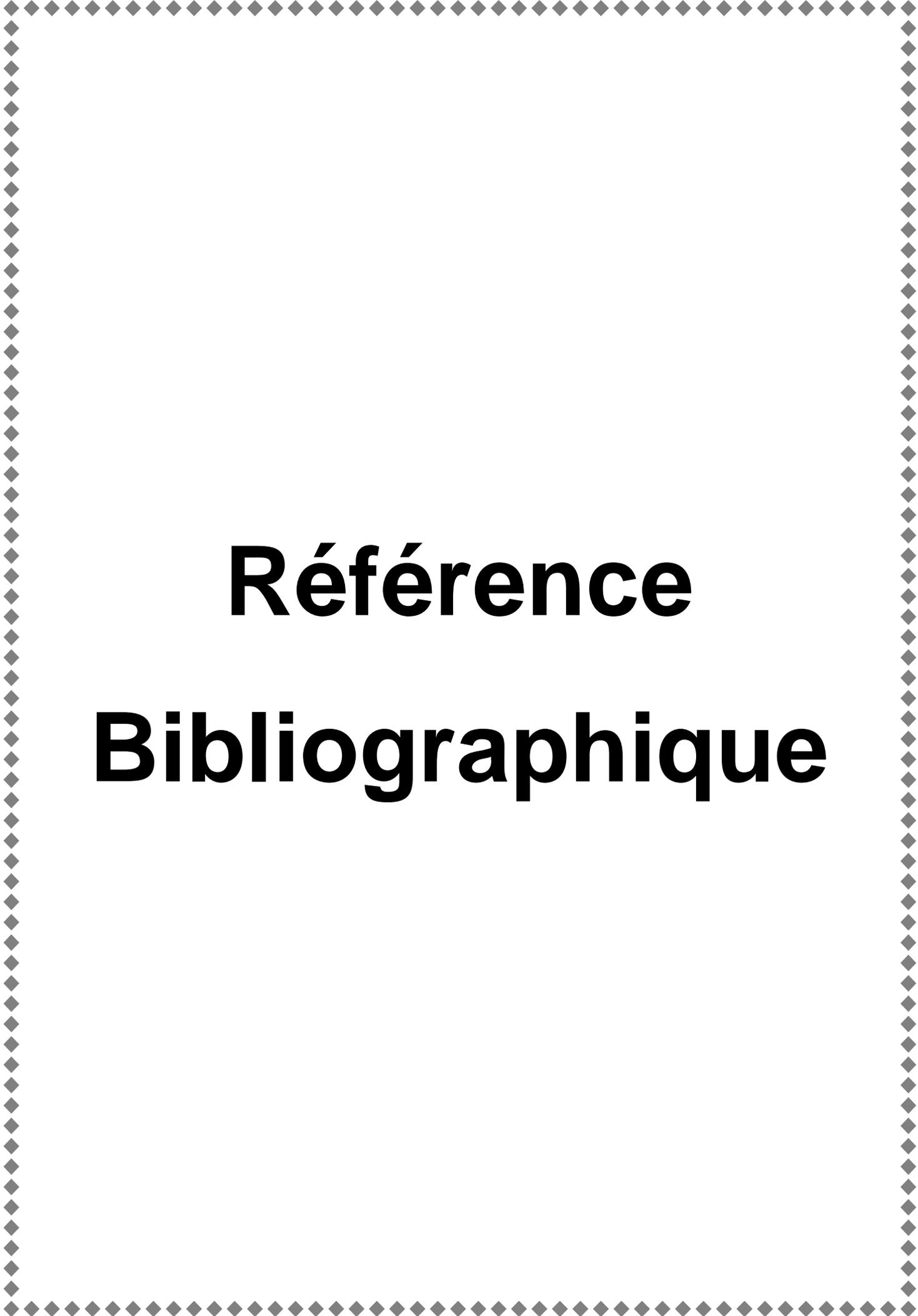
En effet, les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances biologiquement actives.

Sur la base de notre étude sur la poudre d'écorce de grenade, nous pouvons confirmer qu'elle exerce un effet inhibiteur sur de nombreux germes pathogènes étant donné que c'est une excellente source de poly phénols et d'alcaloïdes.

La teneur en molécules bioactives varie selon la nature des solvants utilisés et ayant des polarités différentes.

D'après ces résultats, la pelure de grenade est considérée comme une source importante de molécules à activité antimicrobienne aux multiples usages, notamment dans le traitement des infections et pathologies du tractus digestif dites gastroduodénales, d'autant plus les remèdes naturels traditionnels recommandent l'usage des écorces de grenade pour soigner les maladies de l'estomac, particulièrement les ulcères dont l'origine est actuellement démontré, lié au développement d'une bactérie *Helicobacter pylori* qui colonise les muqueuses gastriques.

En perspectives à cette étude, nous recommandons l'usage d'autres solvants d'extraction (méthanol, acétyle d'éther, acétone) des principes actifs des écorces de grenade sur de nombreuses espèces bactériennes et fongiques responsables de maladies gastroduodénales. Nous proposons également de tester les fractions purifiées des polyphénols des écorces de grenade (flavonoïdes, flavones, flavonones, tanins, polysaccharides, alcaloïdes et autres).



Référence

Bibliographique

Référence Bibliographique

A

- Abdel-Moneim, AM, Al-Kahtani, MA et Elmenshawy, OM** (2012). Biomarqueurs histopathologiques dans les branchies et le foie d'*Oreochromis niloticus* provenant d'environnement de zones humides polluées , Arabie saoudite . Chimiosphère, 88,1028-1035.
- **Ahmed. S-A, Abood. N.H, Al-Janabi .A-A** , Antimicrobial Effect of Pomegranate Peel Extract on Some Pathogenic Microorganisms, Eng. & Tech. Journal, 31 : 316-324, 2013.
- **AicheG– Iratni**, Thèse de Doctorat, activités biologiques d'intérêt médical d'extraits de Feuilles Pistacialentiscus et d'Origanummajorana Université de Tizi-Ouzou, 2016, p12
- Al-Zoreky NS.**, 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit peels. International Journal of Food microbiology 134, 244-248.
- Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B. Et Weil J.A.** (2004).Free radical scavengingcapacity and antioxidant activity of selected plant speciesfrom the Canadian prairies. Food Chemistry, 84, 551-562.

B

- Bakhtaoui H.**, Mémoire de Mastère, Effet des extraits phénoliques des écorces de grenade (*Punica granatum. L*) sur l'évolution des paramètres physicochimiques et microbiologiques d'un lait fermenté de type yaourt, Université de Mostaganem, 2019, p5, 6, 7, 14, 17, 18,19
- Belentine.**,(2006)The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and during storage of ground beef. Meat Science.73,p.413-421.
- Basu A., Penugonda K.** (2009). Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. Nutr Rev. 67(1).
- Ben Abdennebi A.**, (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 insulino-indépendante de l'AMPK, Université de Montréal,P61.
- Benmeziane D., Bedja B.**, Mémoire de Mastère, effet de l'extrait acétonique de l'écorce de deux variétés de grande (quares et lahlou) sur candida albicans Université de Béjaia, 2012, p3, 4, 7,9.
- Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., and Aouni1 M,** (2007).Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities.J.Pharmaco.Bio.45 (5):421–428.

Référence Bibliographique

-**Benyahia H., Hadbi F.**, Mémoire de Mastère, Microencapsulation de la poudre de l'écorce de grenade(PEG) par coacervation complexe (pectine/caséine): Essai d'incorporation dans le yaourt, Université de Boumerdes, 2016, p8, 9.

-**Bohrom N** .1997 : les huiles essentielles extraites des plantes médicinales : moyen efficace de lutte contre les ravageurs de denrées alimentaires stockées. Université du Maroc p162

-**Boudjouref M**,(2011). Etude de l'activité antioxydant et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L.P-51.

-**Braga L.C., Shupp J.W., Cummings C., Jett M., Takahashi J.A., Carmo L.S., Chartone-Souza E Et Nascimento A.M.** (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. Journal Ethnopharmacol, 96, 335-339.

-**Baritel F.** (1989). Le thème des arbres fruitiers dans les mosaïques à iconographie cynégétique du Proche-Orient (IVe-VIIIe siècles). Bulletin de la Société nationale des Antiquaires de France. 1987:165-173.

C

-**Calin, S.A., et Carboneli, B.A.A.** 2005. La grenade cultivées en Espagne Punicalagine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum, université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.

-**Chaouche T. M**,(2014).Contribution à l'étude des activites antioxydantes et Anti microbiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de Doctorat en Biologie Option : Biochimie. Université de Tlemcen. 122 pages.

D

-**Dethier M**,(1996).Contribution à l'étude des plantes aromatiques du Burundi, Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, 275 p.

F

-**Fleuriet, A., Jay-Allemand. C. Macheix. J.J.**,(2005). Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes p121- 216.

Référence Bibliographique

G

-**Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö. İ., Oktay, M., et Büyükokuroğlu, M. E.** (2003). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urticadioica*L.). *Journal of ethnopharmacology*, 90(2-3), 205-215.

H

-**Haidari M., Ali M., Casscell S.W. Et Madjid M.** (2009). Pomegranate (*Punicagranatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has synergistic effect with oseltamivir.

I

-**Ismail.T, P. Sestili, S. Akhtar,** Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects, *Journal of Ethnopharmacology* 143: 397–405, 2012.

J

-**Jacob J., Lakshmanapermalsamy L., Illuri D., Bhosle D., Sangli G.K. Et Mundkinajeddu D.** (2018). In vitro evaluation of antioxidant potential of isolated compounds and various extracts of peel of *punica granatum* L. *Pharmacognosy* 10(1): 44- 48.

L

-**Lansky E.P., Newman R.A. (2007).** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*. 109:177-206.

-**Lansky.E, Harrison .G, Froom .P, Jiang.W** , Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel, *Investigational New Drugs* 23: 121–122, 2005.

-**Larosa M., Gonzales-Sarnas A., Dolara P. Et Espina J.C.** (2010). Anti inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nut Biochem*. 21(8):717–25.

-**Lee C.J., Chen L.G., Liang W.L. And Wanga C.C.** (2010). Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem*. 118:315–22.

Référence Bibliographique

-Li Y.,Guo C., Yang J., Wei J., Xu J. and Cheng S., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pome granate peel extract in comparison with pome granate pulp extract. Food Chem.96 :254-260.

M

-Madrigal-Carballo S., Rodriguez G., Krueger C.G., Dreher M. Et Reed Jd.(2009). Pomegranate (*Punica granatum L*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. Journal Funtional Foods, 1, 324-329.

-Melgarejo P., Salazar D. (2003). Tratado de Fruticultura Para Zonas Áridas y Semiáridas, vol.II. AMV Ediciones y Mundi-Prensa, Madrid.120:500-503.

-Moussaid M., Elamrani A A., Berhal C., Moussaid H., Bourhim1 N., Benaissa M,(2012). Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: Marrubiumvulgare (L.) and Origanummajorana (L.). International journal of natural products research, 1 (1), 11-13.

-Mutai C,(2009), Bii C, Vagias C, Abatis D, Roussis V ; « Antimicrobial activity of Acacia melliferaextracts and lupanetrirpenes»; Journal of Ethnopharmacology.

N

-Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y,(2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of Artemisia campestris (Astraceae) and Ziziphus lotus (Rhamnaceae).Arab. J. Chem. 3: 79–84.

-Negi P. and Jayaprasha, J., (2003). Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. Journal of food science, Vol68,No.4,pp. 1473-1477.

-Neurath A.R., Strick N., Li Y.Y. Et Debnath A.K. (2004). *Punica granatum*(Pomegranate) juice pro-vides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. Annals New York Academy Of Sciences 1056: 311-327.

O

-Opara L. U., Al-Ain M.R.& Al-Shuaibi Y. S.,(2009). Physico-chemical properties, vitamin C content, and Antimicrobial properties of pomegranate Fruit (*Punica granatum L*). Food Bioprocess technol (2009)2:315-321.

P

-Pascual J.T., Gonzalez M.S., Muriel M.R and Bellid I.S. (1984). Phenolic derivatives from *Punica geanatum* 123 (8):1819-1821.

Référence Bibliographique

-**Parmar H.S. And Kar A.** (2008). Antidiabetic potential of Citrus sinensis and Punica Granatum peel extracts in alloxan-treated male mice. *BioFac* 31(1):17–24.

-**Prashanth D., Asha M.K. And Amit A.** (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum* Fitoterapia. N°72. Pages 171-173.

R

-**Rhayour K.**(2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès.Maroc.158 p.

-**Reddy M. K, Gupta S. K, Jacob M. R, Khan S. L., Ferrira, D.,** (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tanin-rich fraction, ellagitannins and phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Medicine*, 73(5), 461-467.

-**Reguieg Ysaad A et Hammadi K.** (2017). In Vitro Antimicrobial Activity of Phenolic Extracts of the Pomegranate (*Punica granatum*). *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4 (6), 100-107.

-**Reguieg, M., yssaad, A.** (2019). L'effet de *punica granatum* sur la flore gastrique .etude in vitro et in vivo chez le rat. Université abdelhamid ben badis de mostaganem.

-**Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., Mata R.**(1992) Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacology*. 35 : 275-283.

-**Rosenblate M, Hayek T, Aviram M.**(2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis* ;187 :363-371.

S

-**Saihi R .**(2011), Etude phytochimique, Extraction des produits actifs de la plante *Artemisia campestris* de la région de Djalfa. Mise en évidence de l'activité biologique, Mémoire, Université d'Oran, P70.

-**Sari M., Biondi D. M., Kaâbeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C., Ruberto G.**(2006). Chemical composition, antimicrobial and Antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Des f. *Flavour and Fragrance Journal*.21: 890-898.

Référence Bibliographique

-**Seeram N.P., Adams L.S. And Henning S.M.** (2004). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagine, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nut Biochem* 16:360–7.

-**SPICHIGER R.-E., SAVOLAINEN V., et al.** - 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 pages.

T

-**Tezcan F., Gültekin-Özgülven M., Diken T., Özçelik B. et Bedia Erim F.** (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115 : 873–877.

-**Tomás I, Henderson B, Diz P, Donos N.** (2010) In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.)

-**Tzulker R., Glazer I., Bar-Ilan I., Holland D., Aviram M. Et Amir R.** (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 55, 9559-9570.

W

-**Wald E.**, Thèse de Doctorat, Le grenadier (*Punica granatum*) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes, Université de Lorraine, 2009, p9, 12, 14, 20, 52,53.

Z

-**Zeggwagh, a. lahlou, y. bousliman ,y** (2013). enquête sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie utilisée par un herboriste à fès, maroc. faculté de médecine et de pharmacie de rabat- maroc .