République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère d'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Dr. Yahia Farès de Médéa

Faculté des Sciences

Présenté pour obtenir le diplôme de :

Master En : Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes d'éxtrait des écorces de fruit de *punica aranatum*

Présenté par :

ALLOUCHE SOUMIA

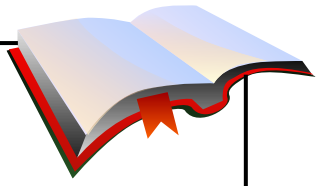
ALIANE MERIEM

Soutenue publiquement le : 11-09- 2019

Soutenu devant le jury composé de:

•Présidente:	Hoceini .A	MCB	Université de Medea
•Eexaminateure :	Boumediene	FMA	Université de Medea
•Eexaminateure :	Zergoug.A	MAB	Université de Medea
•Encadreur :	Belkacem .I	MAB	Université de Medea

Médéa, 2018/2019



Remmercement :

Avant tout, nous remercions le BON DIEU(الله) Tout Puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.

Pais et salut sur notre premier éducateur(محمد صلى الله عليه وسلم)le prophète pour ce qu'il a donné à l'humanité.

Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à notre enseignante et encadreur Mme belcacemimmane pour sa disponibilité, son sérieux et ses conseils judicieux.

Nos remerciements vont également aux membres de jury Mr et Mmepour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche.

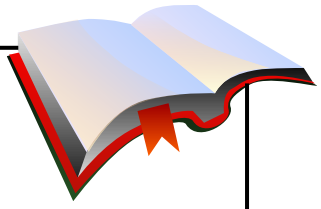
On remercie également tous nos amis et collègues de la promotion de microbiologie 2018/2019

Enfin, on tient à exprimer nos gratitude éternelle à nos familles tous par leur nom, pour leur patience et leur soutien illimité au cours de nos années scolaires dans les moments difficiles.

Un grand merci à toutes les personnes qui nous ont aidées et contribuées, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.



Allouche Soumia et allianne mariem



Dedicace :

Je commence par rendre grâce à Dieu, pour la patience, la compétence et le courage qu'il m'adonné pour arriver à ce stade et de m'avoir donné la force d'accomplir mes études.

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions, je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents (Allouche ayache et Gassiaycha). Vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie. Avec toute ma tendresse.

A Mes chers frères(Ahmed ,soufiane ,farouk ,amine ,billale et yacine)

Et mes chers sœurs (nawal ,razika ,nadia et manal) :

Je vous souhaite beaucoup de réussite dans tout ce que vous allez entreprendre.

A la joie et le sourire de ma famille(israa ,mohamed,abd almatine,allaa ,abd alah,illaf,anasse,yasser,sirine,yacine et diyaa)

Je vous souhaite tout le bonheur et le succés dans votre vie.

A toute ma famille«allouche» et toute ma famille«Gassi»

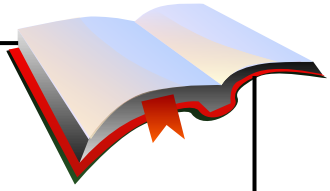
Et tous mes amies :
En souvenir de notre complicité et des bons moments passés ensemble

Nulle expression ne saurait exprimer mes sentiments envers vous tous.

A tous ceux qui m'aiment.

Allouchesoumia





Dédicace :

Je dédie ce modeste travail à :

Mon très cher père pour tous ce qu'il a fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour ses encouragements et ses orientations.

Ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa patience.

À mon cher mari, ma moitié, l'homme de valeur, mon mentor, mon soutien et mon équilibre, qui je le trouve toujours à mes cotés, qui m'a toujours encouragé et qui a été compréhensif et patient.

À mon ange, ma princesse adorée kawther , que dieu tout puissant te donne une long vie avec beaucoup de santé et réussite et te préserve de mal.

Mes chers sœurs et frère « imene ,sousi, yasser »

À la pencée de ma soeure Amina qui ma encouragé sur l'étude.

Mes chères neveux et nièces « amina ,abdelmonim »

Mes amies « Ikram ,asma , maria , rania » , je vous dédié ce travail en vous souhaitons un avenir radieux.

Mes enseignants qui m'ont suivi tout au long de mon cursus universitaire.

A tous mes collègues de la promotion 2019 microbiologie .



Aliannemeriem

Résumé :

Les extrais naturels des plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques. Pour cela nous avons établi une étude expérimentale pour déterminer l'activité antioxydante, l'effet antibactérien des extraits obtenus à partir d'une plante qui a une grande valeur pharmaceutique, soit le *Punicagranatum.* Les extraits organiques de ce dernier ont été obtenus par macération en utilisant un solvant organique il s'agit du l'acétone. La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de (95 mgEAG/g) . Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), leur teneur est de (11 mg EQ/g) . Le pouvoir antioxydant a été évalué par la technique de piégeage du radical libre (DPPH) et la réduction du fer (FRAP). Pour le premier test les valeurs d'IC50 ont été estimées à (4.8mg/ml) éxtraitacétonique et (3,2mg/ml) pour l'acide ascorbique . Pour le second test nous avons obtenus les valeurs de densité optique de (1.2 DO) pour l'extrait acétonique et (0,8 DO) pour l'acide ascorbique . Le pouvoir antimicrobien a été déterminé sur 4 souches microbiennes de référence soient *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus cereus*ATCC10876 ,*Pseudomonasaerugenosa* ATCC27853selon la méthode de diffusion de disques. Les résultats indiquent que les deux souches *E. coli* et *B cereus*ont été les plus sensibles, nous avons observé une meilleure résistance de *Staphylococcus aureus et Pseudomonas aerogenosa*.
Nos résultats nous a permis d'affirmer que les extraits de l'écorce de grenade ont été
plus riches en composés phénoliques et ont montré une activité antioxydante et antimicrobien très importante.

Mots-clés : *Punica granatum,*Polyphénols, Flavonoïdes, antioxydant, antimicrobienne .

Summary :

Natural plant extracts contain a variety of phenolic compounds to which various biological activities are attributed. For this we have established in an experimental study to determinethe antioxidant activity, the antibacterial effect of extracts obtained from a plant which has a great pharmaceutical value, is Punica granatum. The organic extracts of the latter were obtained by maceration using an organic solvent it is acetone.

The total content of phenoliccompounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, it is (95 mgEAG/g). Theflavonoids were evaluated using the aluminum chloride method (AlCl3), their content is(11 mg EQ/g)). Antioxidant potency was evaluated by free radical scavenging (DPPH) and iron reduction (FRAP) techniques. For the first test the IC50 values were estimated at (4.8mg / ml) acetone extract and (3.2mg / ml) for ascorbic acid. For the second test (1.2) for acetoneextract and (0.8) for ascorbic acid. The antimicrobial activity was determined on 4 microbialstrains Staphylococcus aureusATCC29213, Escherichia coli ATCC25922, Bacillus cereus ATCC10876, Pseudomonas aerogenosa ATCC27853.

According to the disk diffusion method. The results indicate that E. coli and B cereus are the most sensitive and we note a better resistance of Staphylococcus aureus, Pseudomonas aerogenosa.

Our résults allowed us to affirm that the pomegranate barke extracts were richer in phénolic compounds and showed a very important antioxidant and antimicrobial activity

Keywords: Polyphenols, Flavonoids, antioxidant, antimicrobial, pinuca granatum

الملخص :
تحتوي المستخلصات النباتية الطبيعية على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية التي تنسب إليها الأنشطة البيولوجية المختلفة. لهذا أنشأنا في دراسة تجريبية لتحديد نشاط مضادات الأكسدة ، والتأثير المضاد للبكتيريا من المستخلصات التي تم الحصول عليها من نبتة لها قيمة صيدلية كبيرة ، هي Punica granatum. تم الحصول على المستخلصات العضوية من الأخير بواسطة maceration باستخدام مذيب عضوي وهو الأسيتون. تم تحديد المحتوى الكلي للمركبات الفينوليةباستخدام كاشف Folin-Ciocalteu، وهو (95 mgEAG/g)تم تقييم الفلافونويدات باستخدام طريقة كلوريد الألومنيوم (AlCl3) ، محتواها (11 mg EQ/g)). تم تقييم فعالية مضادات الأكسدة عن طريق تقنيات إزالة الجذور الحرة (DPPH) وخفض الحديد (FRAP). في الاختبار الأول ، قدرت قيم IC50بمستخلص الأسيتون (4.8ملجم / مل) و (3.2ملجم / مل) لحمض الأسكوربيك. للاختبار الثاني (1.2) لاستخراج الأسيتون و (0.8) لحمض الأسكوربيك. تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على 4 ميكروبات Staphylococcus aureusATCC29213 وEscherichia coliATCC25922 و*Bacillus cereus*ATCC10876 و*Pseudomonas aerugenosa* ATCC27853

وفقا لطريقة نشرالقرصتشيرالنتائج الى ان سلالتي E.coli و*Bacillus cereus* *هما الاكثر حساسية ولاحظنا مقاومة جيدة ل* Staphylococcus aureus و*Pseudomonas aerugenosa*

سمحت لنا نتائجنا بالتاكيد على ان مستخلصات لحاء الرمان كانت اكثر ثراء في المركبات الفينولية و اظهرت نشاطا مهما جدا كمضادات الاكسدة ومضادات المكروبات

الكلمات المفتاحية: البوليفينول ، الفلافونويد ، مضادات الأكسدة ، مضادات الميكروبات . Punica granatum.

Liste des abréviations :

mg : Milligramme.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

nm : Nanomètre

% : Pourcentage

DPPH:2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

FRAP : ferric reducing antioxydant power .

NaOH : Hydroxyde de sodium

K3Fe(CN)6 : Ferricyanure de potassium

Tab :tableau

DO :densité optique.

MH :Muller Hinton

BN :bouillon nutritif

Abs : absorbance

I% :pourcentage d'inhibition

mg EQ/g Q :milligramme équivalent de quercitine par gramme d'extrait

mgEAG/g ::milligramme équivalent de acide gallique par gramme d'extrait

ppm :partie par mille

PR :pourcentage d'inhibition

Liste des tableaux :

Tableau01 : Sources de stress oxydant endogènes et exogènes……06

Tableau 02 : Liste des souches bactériennes testées ……...40

Tabeau 03:Aspect,couleur et pourcentage du rendement de l'extrait brut d'écorce de la grenade……..42

Tableau04 :valeur des IC50 des extraits acétonique et de la vitamine C……49

Tableau 05 : Activité antibactérienne des extraits d'écorces de grenades exprimée en diamètre d'inhibition (mm)……..52

Listes des figures :

Figure 01 : l'umbelliférone……...03

Figure 02 : scopolétine…….03

Figure 03 : Squelette de base des flavonoïdes…….04

Figure 04 : squelette de Flavonols……...05

Figure 05: Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées **.**(GSH-Px: glutathion peroxydase, SOD: superoxydedismutase)……..08

Figure 06: Les principaux dommages oxydatifs médiés à l'ADN par les ERO……..11

Figure 07 : Les feuilles du punicagranatum……....18

Figure 08 : Les fleurs du punicagranatum…….19

Figure 09 : La corolle du punicagranatum……. 19

Figure 10 : Les fruits de grenade…….20

Figure 11 : Les grains de punicagranatum……..20

Figure 12 :L'écorce du fruit…….21

Figure 13: Les cibles bactériennes des antibiotiques……...…26

Figure 14 : Observation microscopique de Staphylococcus aureus……..28

Figure 15:la bactérie dans l'espace…….28

Figure 16:observation microscopique de bacillus cererus……...…29

Figure 17: la bactérie dans l'espace……..... 29

Figure 18: illustration de la bacterie……....31

Figure 19 : observation microscopique……....31

Figure 20: la bactérie dans l'espace…….32

Figure 21: observation microscopique de pseudomonasaerogenosa…….….32

Figure 22: Grenade; Ecorce degrenade et poudre d'écorce séchée……33

Figure 23: Protocole d'extraction des composés phénoliques de la poudre d'écorces de Grenade…….34

Figure 24 : extraction de l'extrait d'écorces de la grenade…….35

Figure 25 : Concentration des filtrats par le rotavaport……...35

Figure 26 : Dosage des polyphénols totaux……..…36

Figure 27: Dosage des flavonoïdes……...37

Figure 28 : la reduction de DPPH de sa forme radicalaire a sa forme, non radialaire…….38

Figure 29: Rendement d'extraction…….42

Figure 30: Teneurs des polyphénols totaux des extraits dans les défferents consentrations.....43

Figure 31: Teneurs en flavonoïdes totaux dans l es extraits dans les défferents consentration.....45

Figure 32 : Teneur des extraits en Flavnoides et polyphénols à une concentration de 2 mg/ml…….45

Figure 33: Pouvoir antioxydant du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits……...46

Figure 34 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits……...47

Figure 35 : Pouvoir antioxydant des extraits d'écorces de la grenade…….47

Figure 36 : Pouvoir antioxydant du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique……47

Figure 37: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique……48

Figure 38 : Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique……...48

Figure 39: Pouvoir réducteur de l' extraitacétonique de Punicagranatum testé par la méthode FRAP…….50

Figure 40: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP……50

Figure 41 : Pouvoir réducteur des extraits de Punicagranatum et l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP……..50

Figure 42 : staphylococcus aureus ATCC 29213 ……..52

Figure 43 :bacillus cereus ATCC 10876……52

Sommaire :

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations Introduction générale

1ere Partie. Synthèse bibliographique

Chapitre 01 :lespolyphénoles:structure et propriétés antioxydantes.

1.Classification des composés phénoliques ……...….03

1.1.Acides phénols et les coumarines ……..……03

1.1.1.Acides phénoliques …….03

1.1.2. Acides cinnamiques ……..…03

1.2.Flavonoïdes…….04

1.2.1.Flavonols ……....04

1.2.2.Anthocyanes ……05

1.3.Tanins ……....06

2.Méthodes de caractérisation des composés phénoliques ……..……06

2.1.Dosage des composés phénoliques totaux …….06

2.2.Dosage des composés individuels par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ……..…06

3.Pouvoir antioxydant des polyphénols ……...07

4. Stress oxydant ……..…07

5. Radicaux libres ……08

Sommaire

5.1.Origine des radicaux libres ……08

5.1.1. Sources endogènes ……08

5.1.1.1 Chaine respiratoire mitochondriale……...……08

5.1.1.2. Inflammation……..…09

5.1.1.3- Métaux de transition……...…09

5.1.1.4.- Xanthine oxydase ……...09

5.1.1.5.Métabolisme de l'acide arachidonique……..…10

5.1.1.6. Cytochrome P450 ……...10

5.1.2. Sources exogènes……...10

6. Les conséquences du stress oxydant ……...11

6.1. Dommage de l'ADN……..11

6.2. Oxydation des protéines ……...12

6.3. Oxydation des glucides……12

6.4. Peroxydation lipidique ……..…12

7. Activité antioxydante……13

7.1. Les antioxydants ……..13

7.1.1. Défenses enzymatiques (Les antioxydants primaires)…… ..13

7.1.2.dèfenses non enzymatique(Les antioxydants secondaires) ……..13

8. antioxydant phenolique……14

8.1.Les flavonoïdes ……..14

8.2.Caroténoïdes……14

9.Antioxydants synthétiques……... 14

10.Antioxydants naturels ……15

12. Mécanisme d'action des antioxydants ……...…15

Chapitre 02:le grenadier(*punicagranatum*)

1.Généralité sur le grenadier ……...15

2. Historique du grenadier…….15

3. Etymologie……15

4.Classification…….16

5. Distribution de *P. granatum*……17

6.Compositionphytochimique du fruit, feuille, fleur, racine et écorce du grenadier 18

6.1. Graine 18

6.2. Ecorce du fruit 18

6.3. Feuille 18

6.4. Fleur 19

6.5. Racine et écorce de l'arbre ……19

7. Description botanique ……..…19

7.1.Description générale du grenadier……..19

7.2.Les feuilles……..19

7.3.Les fleurs……20

7.4.Le calice……..20

7.5.La corolle ……..20

7.6.Le gynécée……..21

7.7. Les étamines…….21

7.8.Les fruits……....21

7.9.Les graines……..21

7.10.L'écorce du fruit……21

7.11. L'écorce de la racine……...…22

7.12.L'écorce de la tige……22

8. Propriétés pharmacologiques ……..……22

9. Utilisation traditionnelle……...24

10. Activité biologique…….24

10.1. Activité antioxydants……...24

10.2. Activité anti-inflammatoires……24

10.3. Activité anticancéreuse……...25

10.4. Activité antidiabétique ……25

10.5. Activité antimicrobiennes …….....25

10.6. Activité antiulcéreuse……...25

10.7. Action cicatrisante de la grenade……...….26

10.8. Autres propriétés de grenade……26

11.Toxicité des composés phénoliques de la grenade ……..26

Chapitre 03 : Infections bactériennes et antibiothérapie

1.la définition des infections bactériennes…… 28

2. Les antibiotiques……...….28

2.1.Classification des antibiotiques……..... 28

2.2.mode d'action des antibiotiques…….28

3. Activités antimicrobiennes des polyphénols…….26

4.Les souches bactériennesétudiées……....27

4.*1- Staphylococcus aureus* ……..27

4.1.1-Définition et classification du *Staphylococcus aureus*……..27

4.1.2-Habitat…….28

4.1.2.1-Chez l'êtrevivant……..28

4.1.2.2-Dans l'environnement ……..28

4.1.2.3- Dans les aliments et leur environnement de production……..…28

4. 1.3-Pouvoir pathogène…….....28

4.2-Bacillus cereus……..29

4.2.1-Principales caractéristiques microbiologiques ……29

4.2.2.l'habitats (Dans les aliments et leur environnement de production) ……..29

4.2.3.lepouvoire pathogène ……30

4.3. Escherichia coli…… 30

4.3.1.Caractères biochimiques ……31

4.3.2. Caractères antigéniques……..31

4.3.3.Pouvoir pathogène ……...31

4.4.Pseudomonasaeruginosa ……...31

4.4.1.Pouvoire pathogène……32

2 eme partie :partie pratique

Chapitre 04 : Matériels et méthodes :

1.Matériel végétal ……33

2. Extraction et dosage des polyphenols ……..33

2.1. Préparation de l'extrait d'écorces de la grenade (*Punicagranatum*) ……...….33

2.2.Diagramme d'éxtraction……..…34

2.3.Détermination du rendement ……35

2.4.Détermination de la teneur en polyphénols totaux ……36

2.4.1.Principe ……..….36

2.4.2.Mode opératoire……..….36

2.5. Détermination de la teneur en flavonoïdes ……..….37

2.5.1.Principe ……..…37

2.5.2.Mode opératoire ……..37

3. Etude de l'activité antioxydante ……...37

3.1. Méthode DPPH (2.2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) ……38

3.1.1. Principe ……..…38

3.1.2.Mode opératoire ……..38

3.2. Méthode FRAP (Ferricreducingantioxidant power) ……...39

3.2.1. Principe ……..39

3.2.2. Mode opératoire ……39

4. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits de plante ……39

4.1. Principe ……40

4.2. Protocole expérimental ……40

4.2.1.Les souches microbiennes ……..….40

4.2.2. Repiquage des espèces bactériennes et préparation d'inoculum ……...….40

4.2.3. Préparation des solutions ……...41

4.2.4. Méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques) …….....41

5.Analyse statistique ……....41

Chapitre 05 :Résultats et discussions

1.Rendementd'extraction…….....42

2.Etude quantitative des extraits……...… 43

2.1.Dosage des polyphénols totaux(PPT)…….43

2.2.Dosage des flavonoïdes totaux (FVT).…….44

3.Evaluation de l'activité antioxydante ……45

3.1.Méthode du radical libre DPPH …….45

3.2. MéthodeFRAP(Ferric reducing antioxidant power) ……50

4.Activité antimicrobiennes……..52

Conclusion

……...54References Bibliographique

Sommaire

Annexe

Introduction

Les plantes ont constitué le premier et principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme et ce, pendant de nombreux siècles. Dans diverses civilisations et sur tous les continents, les pharmacopées végétales se sont développées et enrichies grâce à l'empirisme. Avec un don d'observation inégalé, les anciens ont pu mettre en évidence des propriétés curatives ou préventives des plantes médicinales qui n'ont d'ailleurs, jamais été démenties par l'usage **[1]**.

Dans plusieurs régions d'Afrique, les plantes médicinales représentent pratiquement le seul arsenal thérapeutique à disposition des guérisseurs traditionnels qui soignent dans certains cas plus de 90% de la population. Il est donc indispensable d'étudier ces plantes et de donner une base scientifique pour leur utilisation **[2].**

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des produits chimiques qu'elles synthétisent, des métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence, ceux-ci englobent des protéines, des lipides et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et à la reproduction. De plus, elles synthétisent une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires qu'ils sont utilisés par l'homme dans son arsenal thérapeutique, il s'agit des principes actifs connue par leurs divers activités biologiques **[3].**

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 médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes …etc.L'Algérie, de par sa gamme de climats très variée et sa situation géographique, possède un ensemble considérable d'espèces naturelles qui représentent un patrimoine phytogénétique de très grande importance vu leur mode de répartition spatiale et leur rôle dans l'équilibre écologique **[4]**. La valorisation de ces ressources est devenue indispensable. A cet effet, nous nous sommes intéressés à étudier l'espèce *Punicagranatum*et plus particulièrement, à leurs métabolites secondaires : Les polyphénols

Le genre Punica est largement distribué surtout dans les régions semi arides. 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 *Punicagranatum*. Cet arbre largement utilisée pour traiter les troubles digestives a constitué le sujet de plusieurs études qui ont déterminé leurs compositions chimiques **[5]**, ainsi que les propriétés biologiques.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antibactériennes de l'extrait acétonique des écorces de *Punicagranatum*. La majorité des recherches ont étudié les huiles essentielles, alors que certaines d'entre elles ont étudié les extraits organiques et aqueux. Le présent travail a pour objectif d'extraire les polyphénols totaux, avec la détermination de la concentration de certains groupes, comme il vise à tester les activités biologiques des différents extraits organiques surtout l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne.

Notre travail est structuré en deux parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres. Le premier chapitre aborde des généralités sur les polyphénols : structure et propriétés antioxydantes, le deuxième estconsacré à la description botanique de l'espèce végétale étudiéele grenadier (*Punicagranatum*), tandis que le troisième chapitre, s'intéresse aux souches bactériennes étudiées.

La partie expérimentale est subdivisée en deux chapitres, le premier (quatrième chapitre) présente le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail. Le second (cinquième chapitre) est réservé à la présentation et à la discussion de l'ensemble des résultats obtenus. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale qui résumera l'ensemble de ces résultats.

Synthèse Bibliographique

1- Classification des composés phénoliques :

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**[6].** 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**[6].**

1-1-Acides phénols et les coumarines :

1-1-1-Acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales **[7].** 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 **[8].**

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque **[9]** et les dérivés de l'acide cinnamique [10]. 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 [10]. 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 **[11]**.

1-1-2- Acides cinnamiques :

Ces acides 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 **[12].**

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 **[13].**

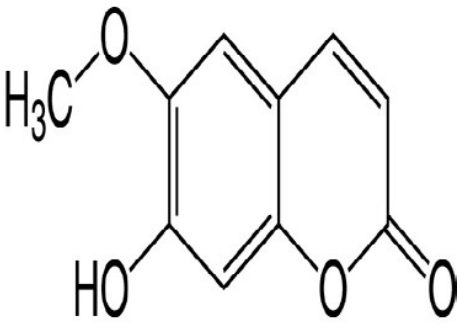


Figure 01 : l'umbelliférone

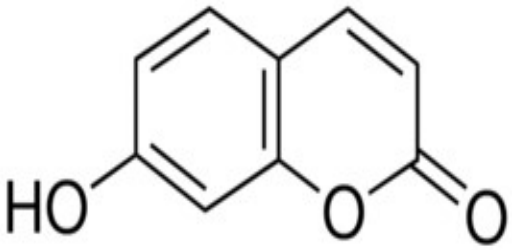


Figure 02 : scopolétine

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 [9].

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 bétalaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire [14]. 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 chaine en C3**[15].**

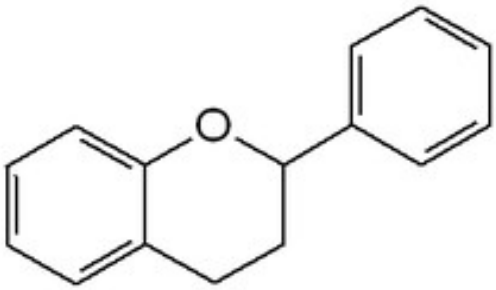


Figure 03 : Squelette de base des flavonoïdes .

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 **[13].**

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 [16]. La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines**[17].**

Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure des flavonoïdes, il convient de citer notamment:

1-2-1-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 **[9].**

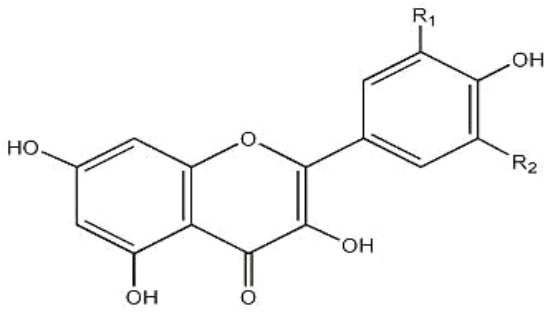


Figure 04 : squelette de Flavonols

1-2-2-Anthocyanes :

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et Kuanos, bleu violet) est un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés **[9].** 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 [18].

Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'oeil 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 [19].

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 **[9].** 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.

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 [20]. 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.

2-Méthodes de caractérisation des composés phénoliques :

2-1- Dosage des composés phénoliques totaux :

Les composes phénoliques peuvent être doses soit dans leur totalité soit individuellement après extraction du matériel végétal. Les méthodes de dosage des composes totaux sont généralement basées sur l'oxydation de ces composés et le développement d'une coloration.

La méthode la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu. Elle est basée sur la réduction d'un mélange d'acides phosphotungistique et phosphomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu) en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène **[21].**

2-2-Dosage des composés individuels par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) :

La méthode de dosage la plus largement utilisées pour séparer les composes phénoliques est la séparation par CLHP souvent en phase inverse (la plus utilisée étant l'octadecylsilice ou C18. Les gradients d'élution comportent en général des proportions croissantes de méthanol ou d'aceton nitrile dans de l'eau acidifiée par de l'acide formique ou

acétique. Les composes sont élues par ordre de polarité croissante : les acides hydroxycinnamiques sont donc généralement élues avant les flavonoïdes. Pour ces derniers, les aglycones sortent généralement après leurs dérives glycolyses La détection est basée sur l'absorption caractéristique des poly phénols dans l'UV **[22]**.

3-Pouvoir antioxydant des polyphénols :

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants **[23]** qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leurs confèrent une activité antioxydante aussi importante Les groupes hydroxyledes polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs 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 simpliqués dans la production de radicaux libres Cependant,les composés phénoliques peuvent agir comme des prooxydants **[24]**.

4. Stress oxydant :

Élément indispensable à notre survie, à notre vie, à notre développement, à notre capacité d'adaptation ; l'oxygène est également à l'origine de toxicité, d'acidité, d'altération, de dégénérescence. En effet, le métabolisme de l'oxygène, lorsqu'il est déréglé, peut entraîner de part ce que l'on appelle « le stress oxydant » **.[25]**

Il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN). Radicalaires ou non radicalaires, elles sont produites en permanence par plusieurs types cellulaires dans les organismes aérobies **. [26]**

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants .[25]

5. Radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique, un atome ou une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés **,[27]** ils peuvent être chargés ou non chargés **[28].** Les radicaux libres peuvent être générés à partir de nombreux éléments, mais dans les systèmes biologiques, ce sont ceux impliquant l'oxygène et l'azote qui sont les plus importants **[29]**; soit par scission homolytique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit par scission hétérolytique où un atome reçoit deux électrons lorsque les liaisons covalentes sont brisées. Et également, au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical **.[30]**

Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Les radicaux libres oxygénés ou, plus généralement, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), ainsi que les espèces réactives de l'azote (ERN), sont des produits du métabolisme cellulaire normal **[30]**.

5.1.Origine des radicaux libres :

Il existe deux sources de radicaux libres au quels nous sommes constamment exposés. Une source interne, lorsque les radicaux libres sont produits par nos cellules et une source externe, lorsqu'ils sont produits par notre environnement **.[31]**

5.1.1. Sources endogènes :

5.1.1.1 Chaine respiratoire mitochondriale :

Les conséquences de l'activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des espèces réactives oxygénées **[31].** Neuf enzymes mitochondriales sont responsables d'une production des espèces réactives oxygénées parmi lesquelles : monoamine oxydase (MAO), cytochrome b5 réductase, complexe I et III, succinate déshydrogénase, glycérophosphate déshydrogénase **[32]**

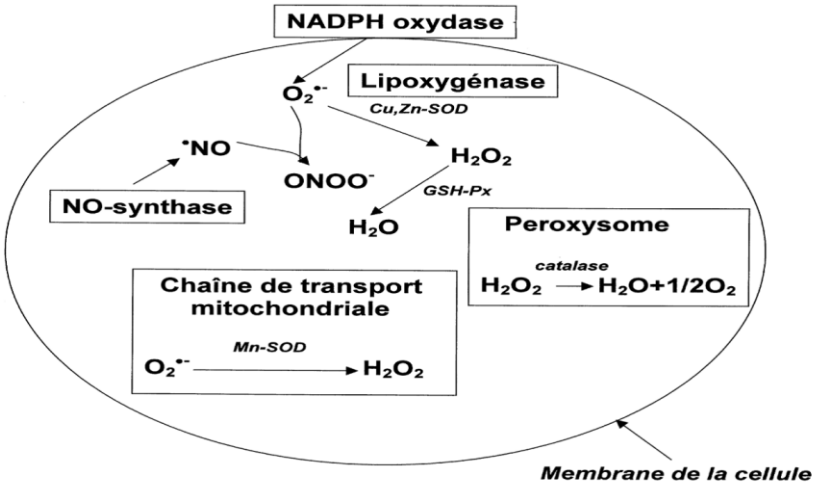


Figure 05: Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées **[33].** (GSH-Px: glutathion peroxydase, SOD: superoxyde dismutase).

5.1.1.2. Inflammation :

L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase), enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les différentes NO synthases à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Rappelons que la production concomitante dans un même lieu de •NO et de superoxyde s'avère très dommageable en donnent naissance au peroxynitrite **.[34]**

5.1.1.3- Métaux de transition :

Les métaux toxiques (chrome, cuivre, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent des radicaux **.**hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive H2O2, par une réaction appelée réaction de Fenton **[34].**

5.1.1.4.- Xanthine oxydase :

En situation ischémique (et hypoxique), le déficit relatif en oxygène et en ATP entraîne la formation d'hypoxanthine. La xanthine déshydrogénase, est alors oxydée en xanthine oxydase et entraîne la formation d'acide urique et de superoxyde ou de peroxydes (Equation 1). L'apport supplémentaire en oxygène (situation d'ischémie-ré-perfusion) favorise la production de superoxyde et d'H2O2, propageant les dommages tissulaires ; la présence

d'ions métalliques, fréquemment libérés à partir de tissus hypoxiques enclins à la nécrose, donnera aussi lieu à la production d'anion hydroxyle [35].

Xanthine + 2O2 + H2O Acide urique + 2O2• - + 2H+ …(1)

5.1.1.5.Métabolisme de l'acide arachidonique :

Durant le métabolisme de l'acide arachidonique, les lipooxygénases et les cyclooxygénases génèrent des espèces réactives oxygénées **[36].** De plus, dans des conditions normales, l'oxyde nitrique synthase convertit l'arginine en citruline et en monoxyde d'azote **[37] .**

5.1.1.6. Cytochrome P450 :

Le cytochrome P450 peut réduire directement O2 en O2•- en causant le stress oxydatif **[38].** Le cytochrome P450 peut aussi prendre une voie alternative appelée "cycles redox" dans lesquels un substrat accepte un électron du cytochrome P450 et le transfert à l'oxygène générant l'anion superoxyde **[39].**

5.1.2. Sources exogènes :

À côté de ces productions endogènes, il existe des sources exogènes de formes radicalaires oxygénées, liées à une mauvaise hygiène de vie (tableau 06), parmi ces facteurs, on retrouve: Polluants; Radiations; Alcool; Dioxyde de carbone (CO2) atmosphérique **[40].**

Tableau01 : Sources de stress oxydant endogènes et exogènes **.[41]**

Sources exogènes	**Mode de vie**	Tabagisme, Faible consommation en fruits et légumes, alcool, Médicaments, Pilule contraceptive, Exposition au soleil et l'exercice intense ou mal géré
	Environnement	Pollution, Ozone, Amiante, Radiations et le Contacts avec des substances cancérogènes
Sources endogénes	**Mécanismes biochimiques**	Xanthine-oxydase (ischémie-reperfusion), Inflammation, Altération de la fonction endothéliale, Surcharge en fer, Oxydation de l'hémoglobine, Altérations mitochondriales, Biosynthèse des prostaglandines et l'Interventions chirurgicales (Circulation extra-corporelle, transplantations)

6. Les conséquences du stress oxydant :

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, et des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides.

6.1. Dommage de l'ADN :

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiées par OH· peuvent être générées : les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures des brins et des pontages ADN-protéines. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîne l'oxydation des bases, La guanine, par exemple, peut réagir avec OH· pour former la 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement [42].

Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribosecréant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaine simple brin.

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dans la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou

de la transcription), entraine des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine [43].

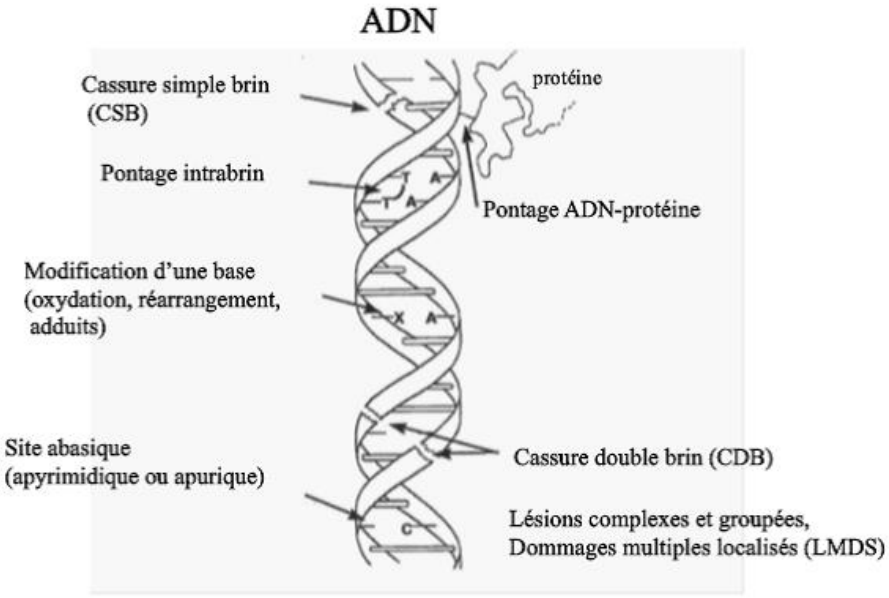


Figure 06: Les principaux dommages oxydatifs médiés à l'ADN par les ERO[44].

6.2. Oxydation des protéines :

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles quicomportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases **[45].**

6.3. Oxydation des glucides :

Le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de tracesmétalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H2O2 et OH•, qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde [46].

6.4. Peroxydation lipidique :

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les espèces réactives [47] .La peroxydation lipidique distingue en 3 phases : l'initiation, la propagation et la terminaison.

7. Activité antioxydante :

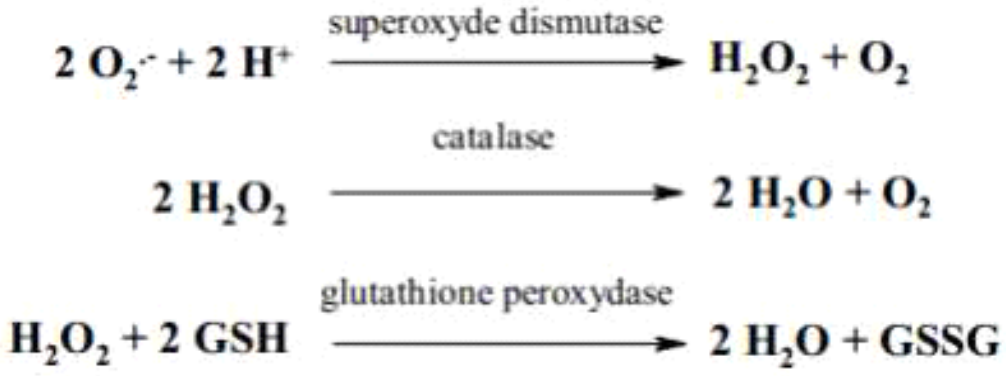
De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que letraumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire [48].

7.1. Les antioxydants :

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire lesdommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule [43].

7.1.1. Défenses enzymatiques (Les antioxydants primaires) :

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) [43]. Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique [49].

7.1.2. dèfenses non enzymatique(Les antioxydants secondaires) :

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une

molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes [49] .
Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont était proposés.
Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β-carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,…etc. [48].

8. antioxydant phénolique :

8.1.Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont un groupe de dérivés naturels du benzo-γ-pyran **(1-7)** qui possèdent de puissantes activités antioxydantes. Les des effets biologiques multiples, comprenant l'activité anti-radicalaire. Il a été rapporté que les flavonoïdes ont un effet protecteur sur les lésions de l'ADN induites par les radicaux hydroxyles. L'un des mécanismes qui explique l'effet protecteur des flavonoïdes sur l'ADN est l'implication des ions métalliques chélatants comme le cuivre ou le fer. Les flavonoïdes complexés avec le cuivre ou le fer empêchent la génération du ROS**[50].**

8.2.Caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont bien connus pour éliminer les radicaux peroxyles plus efficacement par rapport à tout autre ROS. Les radicaux peroxyles générés dans le processus de peroxydation lipidique peuvent endommager les lipides dans la paroi cellulaire. Le piégeage des radicaux peroxyles peut perturber la séquence réactionnelle et empêcher les dommagesaux lipides cellulaires. Les longues chaînes alkyles insaturées des caroténoïdes les rendent hautement lipophiles. Les caroténoïdes sont connus pour jouer un rôle important dans la protection des membranes cellulaires et des lipoprotéines contre les ROS en raison de leur activité de piégeage de radical peroxyle **[51].**

9.Antioxydants synthétiques :

L'anhydride sulfureux (ou dioxyde de soufre SO_2) et ses combinaisons minérales ont été utilisés comme premiers antioxydants des vins et des bières, mais ces composées possèdentun caractère fortement allergisant. L'utilisation des antioxydants synthétiques tels que le hydroxyanisole butylé (BHA) et le hydroxytoluène butylé (BHT) dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique, est actuellement remise en question en raison des risques toxicologiques de ces deux composés. Ces antioxydants sont suspectés à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes.

10.Antioxydants naturels :

Les plantes médicinales sont une source importante d'antioxydants. Les antioxydants naturels augmentent la capacité antioxydante du plasma et réduisent le risque de certaines maladies comme le cancer, les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux. Les métabolites secondaires tels que les phénoliques et les flavonoïdes provenant des plantes ont été signalés comme étant de puissants pièges à radicaux libres.

Ils se trouvent dans toutes les parties des plantes, telles que les feuilles, les fruits, les graines, les racines et l'écorce**.** Il existe une grande variété d'antioxydants naturels qui sont différents dans leur composition, propriétés physiques et chimiques, mécanisme et site d'action **[52].**

12. Mécanisme d'action des antioxydants :

Deux mécanismes principaux d'action ont été proposés pour les antioxydants [53]**.** Le premier est un mécanisme de rupture de chaîne par lequel l'antioxydant primaire donne un électron au radical libreprésent dans le système. Le second mécanisme implique l'élimination des ERO / initiateurs d'espèces réactives d'azote (antioxydants secondaires) par trempage de la chaîne d'initiation du catalyseur. Les antioxydants peuvent également exercer leur effet sur les systèmes biologiques par d'autres mécanismes qui peuvent inclure le don d'électrons, la chélation des ions métalliques, les co-antioxydantsou la régulation de l'expression des gènes **[54].**

1.Généralité sur le grenadier :

Depuis ces dernieres années, une grande attention est accordée auxbienfaits de la consommation réguliere des fruits et légumes sur la sante humaine. Cette valeur nutritive réside dans la grande variete de molécules biologiquement actives (fibres, carotenoides, composes phenoliques, vitamines…) [55]. La grenade est l'un des produits les plus riches en antioxydants notamment les polyphenols solubles, les tanins et les anthocyanes [56]. Ces constituants présentent diverses activités biologiques telles que l'elimination des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne et la diminution des risques de maladies cardiovasculaires, cerebro-vasculaires et certains cancers [57].

Les éxtraits du grenadier peuvent etre utilises aussi pour la prévention ou la guerison de l'atherosclerose, des diarrhées, des ulcère gastriques et des maladies liées a l'oestrogene telle que la maladie de Paget du mamelon[58].

C'est pour ces raisons que la culture du grenadier connait un regain d'interet dans plusieurs pays en raison d'une demande assez forte de ces fruits sur le marche. La grenade, trés anciennement connue dans le monde, est consideree comme un symbole de beaute et de fertilite. Il existe plus de 1000 cultivars de *Punica granatum*, originaires du Moyen-Orient, de la région méditerraneenne, de l'Est de la Chine, de l'Inde, du Sud-Ouest americain, de la Californie et du Méxique [59].

2. Historique du grenadier :

Le grenadier, *Punica granatum*, anciennement connu et apprécié de toutes les civilisations par sa beauté et la jutosité de son fruit antique doté de riches applications ethno-médicales **[60].** Les fruits du grenadier, avec leurs graines, écorces, fleurs et jus, ont été consommés durant des milliers d'années, en tant que nourriture et remèdes **[61].** Il est présent dans les anciens textes grecs, égyptiens, les textes bibliques, le Coran et dans les traditions populaires des différents pays bordant la Méditerranée.

Dans la Grèce antique, Perséphone, fille de Zeus et de Déméter, est enlevée par Hadès et pris dans la pègre. Après une longue période de jeûne, Perséphone mange sept graines d'une grenade du jardin des enfers. Ayant goûté la nourriture des morts, elle se condamne à devenir reine des enfers, et à passer six mois de l'année en ces lieux et six mois sur terre, reproduisant ainsi le cycle des saisons, l'alternance de l'été et de l'hiver. L'ingestion des graines de grenade ne conduit pas à la fertilité, mais à la stérilité cyclique [62].

En Egypte, la grenade était considérée comme le fruit des dieux. Le symbole de la fertilité et de la richesse, en raison de l'abondance de ses graines et de sa forme ronde **[62].** Les grenades étaient aussi un symbole commun de la fertilité dans les rites des mariages bédouins, chinois, grecs, indiens, perses et romains, entre autres. Dans la tradition bouddhiste, la grenade est l'un des trois abondances, de même que la pêche et la main de Buddha, et elle représente l'abondance de la progéniture.

Dans le saint coran, les fruits comme le raisin, la datte, la figue, l'olive et la grenade sont des cadeaux et des fruits célestes de Dieu.

3. Etymologie :

Le grenadier a d'abord été connu sous deux appellations latine ; *Malum granatum*, qui signifie pomme à grains et *Malum punicum* qui signifie pomme de Phénicie **[63]**.

Plus tard, le naturaliste Carl Von Linné nomma le grenadier, *Punica granatum* **[64]** dont le qualificatif générique **Punica** fait allusion à la ville de Carthage, ville ancienne dans la banlieue nord de la Tunisie où poussaient les meilleurs grenadiers. Et celui spécifique **granatum,** signifie granuleux faisant référence à la multiplicité des grains contenus dans le fruit [65].

4.Classification :

Le grenadier, *Punicagranatum,* a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. la classification est la suivante [66] :

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Myrtales
- Famille : Punicaceae
- Genre : Punica.
- Espèce : Punicagranatum

En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c‟est-à-dire des plantes à graines, a été créée par un groupe de botanistes, l‟*Angiosperm Phylogeny Group* ou APG. Cette classification phylogénétique réorganise le règne végétal en fonction des critères moléculaires, s‟intéressant essentiellement à l‟ADN de deux gènes chloroplastiques et d‟un gène nucléaire de ribosome. Ainsi, pour certaines espèces végétales, les résultats moléculaires sont en accord avec les anciennes classifications alors que pour d‟autres espèces végétales, il

est nécessaire de modifier leur position dans la systématique. Ces résultats reconsidèrent la phylogénie des plantes.

Cette nouvelle organisation se compose alors de 462 familles réparties dans 40 ordres

[67].

Que ce soit dans la classification de Linné ou dans la classification APGII, le genre

*Punica*ne possède que deux représentants : *Punicagranatum*, d‟une part, et *Punicaprotopunica*, d‟autre part. Ce dernier est recensé exclusivement sur l‟île de Socotra ou Socotora, située dans l‟océan Indien, au large des côtes de Somalie.

5. Distribution de *P. granatum :*

Le grenadier est une espèce originaire d'Asie occidentale (de l'Himalaya au nord de l'Inde jusqu'en Iran), mais elle a été cultivée et naturalisée depuis les temps anciens dans les régions du bassin méditerranéen. Elle est aussi cultivée dans tous les continents dans des zones tempérées chaudes : comme le Proche orient, Chine, Sud-est des États- Unis, Chili, Argentine. La ville de Grenade en Espagne doit son nom au grenadier.

La culture du grenadier est très ancienne en Tunisie. Elle date, au moins, de l'époque phénicienne. Cette culture s'étend sur l'ensemble du pays sauf dans les zones à altitude. La production de grenades continue à augmenter considérablement. La majeure partie de cette production est destinée au marché local. Les quantités exportées restent relativement faibles et ne dépassent pas 1% de la production totale [68]. Les fruits murissent en automne et sont récoltés pour être utilisés directement ou commercialisés. Les variétés de grenadier cultivées en Tunisie sont toutes locales, très nombreuses et sont en quasi-totalité des « variétés populations» sur lesquelles il n'y a pas des travaux de sélection. La nomenclature est purement locale. Plusieurs régions donnent leurs noms aux variétés cultivées. L'échange de matériel végétal entre différentes régions est très fréquent et les synonymies et homonymies doivent être très nombreuses. Il a été identifié une quinzaine de variétés. Les principales variétés commerciales son: Zehri, Gabsi, Garsi... Les périodes de maturation vont de septembre à décembre et la qualité des fruits est, pour la plupart, satisfaisante [69]. Des récentes investigations ont identifié plus de 60 écotypes nommés principalement en fonction de leurs origines géographiques ainsi que la couleur des fruits [70].

6.Composition phytochimique du fruit, feuille, fleur, racine et écorce du grenadier :

6.1. Graine :

6.1.1. Pépin :

Les pépins de grenade contiennent 12 à 20% de matière grasse par rapport au poids de la graine, avec une prédominance des acide gras insaturés conjugués avec une teneur de 31,8–86,6 % d'un acide gras très rare l'acide punicique (cis 9, trans 11, cis 13) qui est un isomère de l'acide linolénique , 0.7–24.4 % acide linoléique, 0,4–17,7 % oléique, 2,8– 16,7 % stéarique et 0,3–9,9 % palmitique. 95 % des acides gras sont sous forme estérifié, dont 99 % de triacylglycérols[47] . Ils contiennent des constituants mineurs de l'huile incluent les stérols et les stéroïdes sexuels [71] dont la plus forte concentration en estrone (stéroïdes sexuels) du règne végétal [70].

6.1.2. Pulpe (Jus) :

Le jus de grenade a un pouvoir antioxydant trois fois supérieur au thé vert et vin rouge. Il est riche en vitamine : vitamine C, vitamine E et β-carotène, et en polyphénols : catéchine, acide éllagique, acide gallique et éllagitannins [72] ; c'est une source importante en anthocyanines : 3-glucoside et 3,5-diglucoside de delphinidine, cyanidine, et pelargonidine , antioxydants flavonoïdiques puissants, qui lui confèrent sa couleur éclatante, qui augmente en intensité au cours de la maturation [73] .Ainsi que de l'acide citrique et malique et l'acide ascorbique [70].

Le jus contient des minéraux tels que Fe qui est relativement fréquent, Ca, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Sc, Se, Sn, Sr, et Zn [70].

6.2. Ecorce du fruit :

L'écorce du fruit est très riche en flavonoïdes et en tanins [74].Il contient environ 25 % d'ellagitanins [75] et des flavonoïdes tels que : lutéoline, quercétine, et kaempferol Punicalagin et punicalin sont des ellagitanins spécifiques à la grenade[76] .L'écorce contient aussi des polysaccharides complexes partiellement caractérisés [77]. La présence d'alcaloïdes dans l'écorce est équivoque, positive par le test Dragendorff, mais négative par le test Mayer [78].

6.3. Feuille :

Les Feuilles contiennent les mêmes polyphénols que l'écorce. Elles contiennent aussi des glycosides de l'apigénine, une flavone avec des propriétés progestinique et anxiolytique.

6.4. Fleur :

La composition chimique des fleurs est identique à celle de l'écorce, mais elle n'est pas complètement élucidée. Des études sont en cours afin de déterminer leur effet thérapeutique [75].

. **6.5. Racine et écorce de l'arbre :**

Les extraits préparés à partir des racines et écorce de l'arbre ont de puissants effets physiologiques. Leur composition chimique se distingue des autres parties de l'arbre par de forte concentration en alcaloïdes [75].

7. Description botanique :

7.1.Description générale du grenadier

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon su spontanée ou cultivée**[79].**

7.2-Les feuilles

Les feuilles du grenadier 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. .[80]. Elles ne possèdent pas de stipule [79].



Figure 07 : Les feuilles du *punica granatum*

7.3.Les fleurs

Les fleurs du grenadier portent également le nom de balaustes. **[81]**. Elles sont très ornementales. Les fleurs rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé [79]



Figure 08 : Les fleurs du *punica granatum*

7.4.Le calice :

Le calice est formé de 4 à 8 sépales courts, charnus, épais, d'une belle couleur rouge vif, persistants, d'abord dressés puis étalés après la fécondation**[79]**.

7.5. La corolle :

La corolle comprend 4 à 8 pétales minces alternant avec les sépales. Ces pétales sont généralement très colorés, souvent d'un rouge orangé vif, mais pouvant prendre de nombreuses autres teintes selon les variétés, tel que blanc, jaune pâle, crème ou saumon. Ils ont un aspect chiffonné **[79].**



Figure 09 : La corolle du *punica granatum*

7.6.Le gynécée :

Le gynécée est formé de 8 ou 9 carpelles soudés au tube du calice, disposés sur deux verticilles. L'ovaire, infère, est surmonté d'un style conique terminé par une tête stigmatique **[56].**

7.7. Les étamines

Les étamines, libres et très nombreuses, tapissent la paroi interne du réceptacle floral, à partir de la corolle[82] .

7.8.Les fruits

La grenade, est une baie ronde, cortiquée, c'est-à-dire à épicarpe cutinisé et dur, de la taille d'une pomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre. **[83]**. Ce fruit, très coloré, généralement de couleur rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau de teinte blanc jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé. Cette baie est surmontée des restes du calice, formant une couronne dentée, qui la rend facilement identifiable **[83]**.



Figure 10 : Les fruits de grenade

7.9.Les graines

Cette baie renferme de nombreuses graines contenues 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.[**84].**

.



Figure 11 : Les grains de *punica granatum*

7.10.L'écorce du fruit

L'écorce du fruit du grenadier est également appelée malicorium. Il s'agit de la partie dure du fruit. Elle est généralement 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. Ces fragments sont de consistance coriace. Ils sont formés d'un parenchyme de cellules à parois minces, au milieu desquelles on distingue des groupes de cellules pierreuses et des faisceaux fibro-vasculaires**[84]**. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente.



Figure 12 :L'écorce du fruit

7.11. L'écorce de la racine

L'écorce de la racine se présente sous forme de fragments irréguliers, plus ou moins enroulés ou cintrés, d'un millimètre d'épaisseur environ. La face externe gris jaunâtre ou brunâtre montre de larges écailles subéreuses, des rides ou de larges fissures. La face interne jaune verdâtre est lisse et finement striée longitudinalement. La section jaune clair est nette et montre de fines stries transversales et radiales correspondant au liber **[80]**.

7.12.L'écorce de la tige

L'écorce de la tige se présente généralement en fragments tuyautés ou cintrés, plus long que ceux de la racine, à surface externe soit lisse et intacte, soit rugueuse et crevassée, pourvue de nombreuses lenticelles arrondies. Les plaques subéreuses minces sont plus petites que dans la racine [80].

8. Propriétés pharmacologiques :

Toutes les parties du fruit du grenadier semblent avoir des propriétés thérapeutiques **.**Certaines études rapportent que l'écorce, les racines, les feuilles, les fleurs et le tronc ont des

effets médicinaux bénéfiques sur certaines pathologies, principalement dans la prévention et le traitement du cancer par l'inhibition des facteurs pro-inflammatoires et les initiateurs de la tumeur et réduisent également la prolifération cellulaire**[85]**, les maladies cardiovasculaires (effet anti-athérogène) **[86]**, le diabète **[87]**, la maladie d'Alzheimer **[88]**, le Sida **[89]**, la dysfonction érectile ainsi que des propriétés oestrogéniques **[90].**

En médecine Ayurvedique, le grenadier est considéré comme « une pharmacie en soi », il est utilisé pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. L'écorce et les racines sont utilisées traditionnellement pour traiter la dysenterie, les diarrhées, les ulcères et pour traiter les aphtes buccaux. Ils sont connus aussi pour leurs propriétés astringentes, vermifuges et anthelminthiques **[91].**

D'ailleurs, les auteurs **[92]** de l'Inde, **[93]** de Tunisie, et **[94]** du Guatemala, indiquent que les écorces séchées étaient consommées en décoction dans de l'eau pour les mêmes affections citées précédemment. Des mélanges de pépins, jus et d'écorce de grenade ont paradoxalement montré des effets contraceptifs **[95].**

Dans la médecine Unani, les fleurs de cette plante servaient de remède pour le diabète mellitus **[96].** Plusieurs infusions ou décoctions des fleurs de la plante ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée simple et les pertes vaginales **[97].**

Par ailleurs, certaines études démontrent l'efficacité du jus et des polyphénoles présents dans le fruit du grenadier contre les infections virales d'origine alimentaires ainsi qu'un potentiel pour la prévention ou la réduction des infections à norovirus humains **[98]**. Le jus rafraîchissant du fruit de *Punica granatum* L. est recommandé pour guérir les maladies de la vésicule biliaire. Le fruit contient un tannin fort considéré comme une nutrition amère **[97]**.

[99] a rapporté que 80% de l'extrait méthanolique de l'écorce du fruit est un puissant inhibiteur de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia Coli* et *Yersinia enterocolitica*.

Quant à [100] ont montré que l'huile des pépins de grenade, ainsi que les polyphénols présents dans le péricarpe et du jus fermenté supprimerait la prolifération et l'invasion de plusieurs cellules cancéreuses de la prostate. l'huile de pépins de grenade a un potentiel comme agent de chimioprévention topique contre le cancer de la peau, principalement en raison de sa haute teneur en acide punicique **[101].**

L'huile extraite de grenade peut efficacement interdire la production de prostaglandine ou de leucotriène par inhibition des enzymes eicosanoïdes de la cycloxygénase et de la

lipoxygénase de sorte qu'elle peut augmenter l'application de l'huile ou de ses dérivés comme substances anti-inflammatoires internes ou externes **[92].**

Toutefois, ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. Elles ont ainsi été investigués à grande échelle tant dans les modèles *in vitro* qu'*in vivo*, cependant les études chez l'homme restent peu nombreuses. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydantes, anti-carcinogéniques, anti-inflammatoires et antidiabétiques du grenadier.

9. Utilisation traditionnelle :

L'arbuste a de nombreuses utilisations médicinales et cosmétiques: les fleurs fournissent un colorant pour les cheveux, les feuilles et les fleurs donnent des potions pour les gargarismes, l'écorce de fruits astringent et racines fraîches ont des propriétés toniques qui aident dans le traitement des troubles digestifs et intestinaux sévères. Le fruit savoureux produit de grandes quantités de jus de refroidissement [102].

Les écorce de racines, recommandées 15 siècles avant J.C. pour le traitement des vers, ont été employées comme anthelminthique (surtout taenicide) jusqu'à la première moitié du XXe siècle **[103].**

10. Activité biologique :

10.1. Activité antioxydant :

Des études *in vitro* ont montré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadieront 2 à 3 fois la capacité antioxydant du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux[104].

Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et lesanthocyanines.

Les ellagitannins comptent pour 92% de l‟activité antioxydant du jus de grenade et sont concentrés dans l‟écorce, les membranes et les moelles du fruit [105].

10.2. Activité anti-inflammatoires :

Des études *in vivo* ont montré que l‟huile de graines pressées du grenadier inhibe la

cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénae, enzyme clé dans la conversion de l‟acide arachidonique en prostaglandines (principaux médiateurs de l‟inflammation), a étéinhibée de 37% par l‟extrait d‟huile de graines pressées. Lalipooxygénase, qui catalyse la

conversion de l‟acidearachidonique en leukotriènes, aussi médiateurs importants de l‟inflammation, ont été inhibés de 75% par le même extrait [106].

10.3. Activité anticancéreuse :

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont montré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l‟envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l‟apoptose et inhibent le développent de la tumeur [107]. Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l‟apoptose [108].

Une étude clinique en phase II portant sur 46 hommes ayant le cancer de prostate récurent a illustré que 35% des patients montraient une diminution significative du taux sérique de PSA (Prostate SpecificAntigen) durant le traitement avec du jus de grenade. La même étude a indiqué que le grenadier pourrait affecter le cancer de prostate grâce à la combinaison de ses propriétés antiproliférative, apoptotique, antioxydante et antiinflammatoire [109].

10.4. Activité antidiabétique :

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l‟absorption et augmente l’excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL en améliorant lesratios total/HDL et LDL/HDL.

La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques [88]. Sans affecter les paramètres diabétiques [110].

10.5. Activité antimicrobiennes :

L‟écorce du fruit de *Punicagranatum* possède donc, *in vitro*, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d‟autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes [111].

10.6. Activité antiulcéreuse :

L‟écorce de grenade séchée en poudre présente un efficace traitement efficace contre

l'acidité d'estomac et l'ulcère d'estomac [112]. L‟extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l‟estomac induits par l‟aspirine et l‟éthanol grâce à ses propriétés antioxydantes. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d‟extrait hydroalcoolique de

grenade (70% méthanol v/v), le pourcentage d‟inhibition est respectivement de 22,37% et74,21% pour les ulcères induits à l‟aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l‟éthanol [113]

10.7. Action cicatrisante de la grenade :

Comparé 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 10 jours, les rats traités au gel à l‟extrait de peau de grenade ont été guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins [114].

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 [115]

10.8. Autres propriétés de grenade :

Le jus de grenade stimule le foie et la rate. Il renforce la qualité de sang, permettant demieux nourrir les tissus. Il est très régénérant pour le coeur et le tissu reproducteur. Il est aussi très détoxifiant comme le jus de citron, mais sans acidité. Il donne de vitalité et stimule l‟immunité physique et mentale [116].

L‟écorce, les racines de l‟arbre, et parfois mêmes les écorces du fruit, sont utilisées contre les parasites intestinaux, en particulier le vers solitaire (ténia) et la dysenterie amibienne. Elles contiennent des alcaloïdes, dont la pelletiérine, vermifuge efficace contre le ténia, inscrite au Codex de pharmacopée française depuis 1937 [116].

11. Toxicité des composés phénoliques de la grenade :

La grenade est largement consommée par de nombreuses civilisations depuis des milliers d’années, et aucun incident n’est signalé et donc elle ne représente aucun danger pour la santé humaine. Cependant, la consommation de la décoction de l’écorce de l’arbre et aussi du péricarpe du fruit peut provoquer une toxicité qui reste à confirmer. Cette toxicité se manifeste par une inflammation sévère aiguë de l'estomac et même la mort de la personne, cela est dû à la présence des tanins et des alcaloïdes à la fois **[117]**.

Une autre étude élaborée par [118] a montré que les Extraits phénoliques de fruits entiers causent une congestion des organes internes et une élévation de la créatinine in vivo. L'huile de pépins de grenade n'était pas toxique pour les larves de crevettes de saumure **[117],**

mais des réactions allergiques graves et cancer d'oesophage **[118]**suite à une consommation très élevée de grain de grenades **[119]** ont été mentionnés. Le jus de grenade contient des taux élevés en polyphénols (e 2 g/L), et il était considéré comme aliment toxique pour le bétail, une étude a été réalisée sur des rats Sprague-Dawley pour évaluer la toxicité potentielle de ces composés via un régime enrichi en punicalagine à une concentration de 6% administré sur une période de 37 jours. La quantité d'aliments ingérés, l'index d'utilisation alimentaire et le taux de croissance sont plus faibles chez les rats traités durant les 15 premiers jours sans effet toxique significatif. Cela pourrait être dû à la plus faible valeur nutritionnelle de la ration enrichie en punicalagine ainsi qu'à sa faible appétence. Aucune différence significative n'a été observée lors des analyses de sang sauf pour l'urée et les triglycérides qui sont restés à des valeurs faibles durant toute l'expérience. L'analyse histopathologique du foie et des reins a confirmé l'absence de toxicité **[120].**

1. la définition des infections bactériennes :

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne. une infection est l'invasion et le développement de microorganismes dans un organisme vivant ,au détriment de ce dernier , pour causer une infection certains microbes, dits pathogènes, possèdent des facteurs de virulences leur permettant de se multiplier dans l'hote qu'il infectent , l'infection est due à l'invasion et au développement d'organismes vivant [121].

2. Les antibiotiques:

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) **[122].**

2.1.Classification des antibiotiques :

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière celle-ci est la plus fréquemment rencontrée.

Les principales familles chimiques des antibiotiques sont: Bêtalactamines: pénicilline et céphalosporines; Aminosides: streptomycine, gentamycine; Chloramphénicol et thiamphénicol; Cyclines: tétracyclines, doxycycline. Macrolides et apparentés : érythromycine, oléandomycine **[123].**

2.2.mode d'action des antibiotiques :

Le mot « antibiotique » a été proposé la première fois par Sleman Waksman, un pionnier du criblage des sols et découvreur de la streptomycine [124]. Sa définition se basait sur l'application d'un composé chimique, par exemple, son utilité ou un effet de laboratoire. Toutefois, les fonctions ou la classe du composé n'étaient pas prises en compte. Depuis ce temps, le terme « antibiotique » a été interprété de multiples façons, cependant la définition la mieux acceptée est un composé d'origine biologique qui a le pouvoir d'inhiber ou de tuer des microorganismes en interagissant spécifiquement avec leur cible, sans égard pour la classe ou l'origine du composé [124]. Lorsqu'un antibiotique a la capacité d'induire la mort cellulaire, celui-ci est décrit comme étant bactéricide. D'autre part, un antibiotique qui peut seulement inhiber la croissance cellulaire est considéré comme bactériostatique

[125]. Afin d'induire l'un ou l'autre de ces effets, les antibiotiques agissent sur des cibles cellulaires spécifiques. Les cibles bactériennes les plus communes sont la synthèse protéique, l'ADN et la paroi ou les membranes cellulaires [125]. Néanmoins, un modèle d'étude en émergence dicte que l'action bactéricide de certains antibiotiques est causée par leur capacité à stimuler la production de radiaux hydroxyles, ce qui cause un stress oxydatif entraînant des dommages cellulaires aux bactéries, et ultimement leur mort [125]. Il reste que chez plusieurs classes d'antibiotiques, le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé [125].

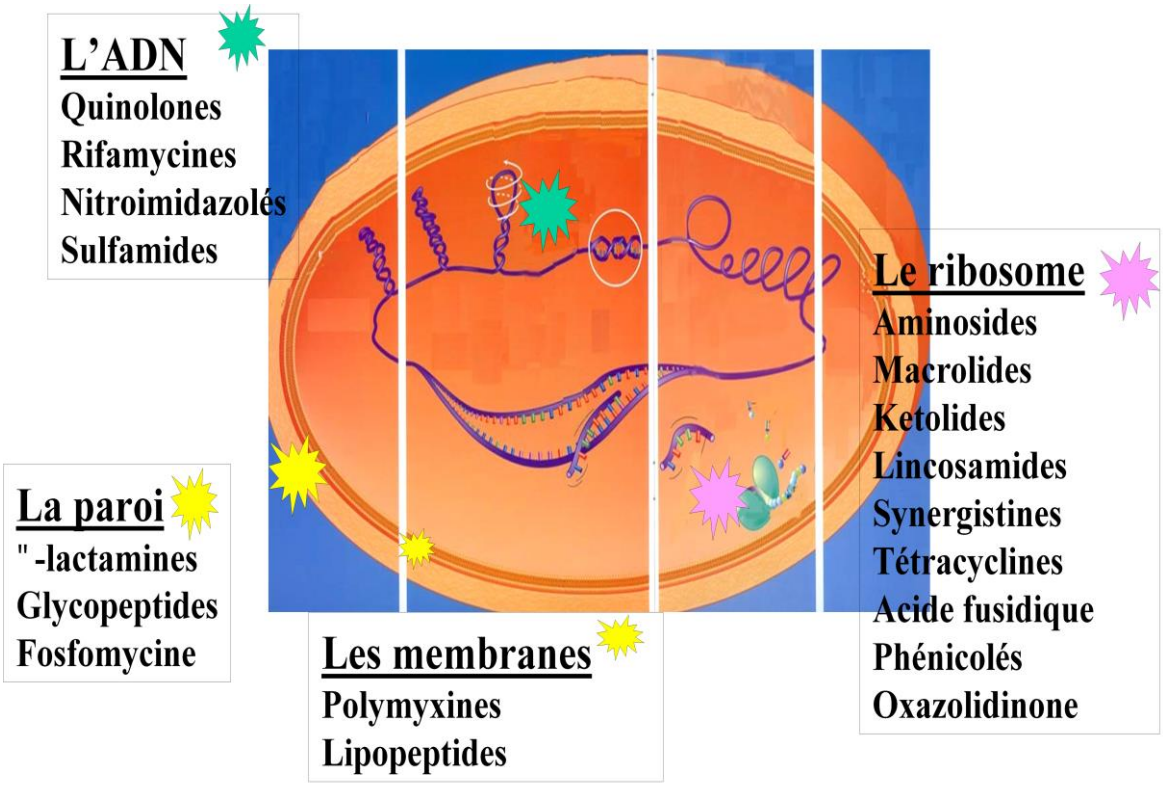


Figure 13: Les cibles bactériennes des antibiotiques [126].

3. Activités antimicrobiennes des polyphénols :

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité [127]. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [128].

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols , à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation

de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques [129]. La quercétine et la naringénine sont rapportés être des inhibiteurs de *Bacillus subtilis, Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus nervous, Staphylococcus epidermis*et *Saccharomyces cerevisiae*[134]. En outre, la morine-3-O-lyxoside, morine-3-O-arabinoside et la quercétine-3-O-arabinoside possèdent une action bactériostatique sur les bactéries pathogènes contaminant les denrées alimentaires y compris *Bacillus stearothermophilus, Brochothrixthermosphacta, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Pseudomonas fluorescens, Salmonella enteric, Staphyloccus aureus* et *Vibrio cholera*. Les flavonones ayant un groupement de sucre ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montré aucune activité inhibitrice envers les microorganismes [130].

Les mécanismes responsables de la toxicité des polyphénoles envers les microorganismes incluent l'inhibition enzymatique par les composés oxydés, probablement via la réaction avec les groupes sulfhydryle ou par les interactions non spécifiques avec les protéines [131]. L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonoles est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'intercaler dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule [129]. La déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rendre perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc (via la propriété de chélation des métaux) sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries [129].

4. Les souches bactériennesétudiées :

4.*1- Staphylococcus aureus :*

4.1.1-Définition et classification du *Staphylococcus aureus :*

Le S. aureus étant un organisme vivant procaryote et une bactérie à Gram positif, il se retrouve donc dans le règne bacteria puis dans le phylum firmicutes. Sa taxonomie complète le positionne dans la classe des Bacilli puis dans l'ordre des Bacilliales.

En 2001, les chercheurs Garrity et Holt ont proposé de radier les *S. aureus* de la famille des Micrococcaceae (genre Micrococcus et Stomatococcus) grâce l'analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) ainsi que d'autres analyses génétiques **[132].**

Sa position taxonomique est maintenant bien définie et il a une famille à son nom :Staphylococcaceae**[133].**

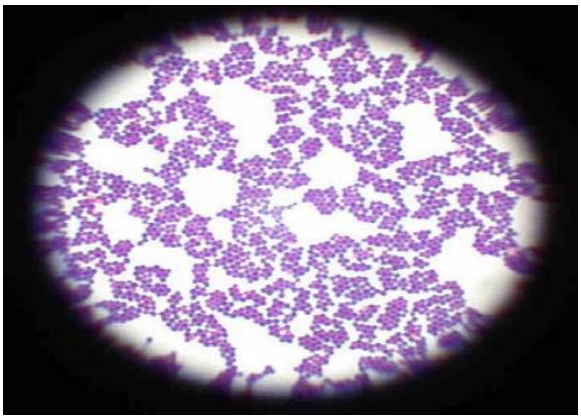


Figure 14 : Observation microscopique de*Staphylococcus aureus*



Figure 15: illustration de la bactérie **.**

4.1.2-Habitat

4.1.2.1-Chez l'êtrevivant

S. aureus fait partie de la flore commensale normale des mammifèreset des oiseaux, à l'inverse de certaines espèces de staphylocoques qui ont, eux un hôte préférentiel. *S. aureus* semble capable de coloniser tous les mammifères (marins et terrestres) même si différents biotypes de souches de *S. aureus* pourraient être raccordés à des hôtes spécifiques. Par exemple, selon une étude de 2003, un biotype dit « abattoir » serait associé aux produits de boucherie et au personnel des unités de production des abattoirs Chez l'homme, *S. aureus*est**[134].** présent sur plusieurs sites corporels. On le repère sur la surface de la peau et des muqueuses, mais il colonise principalement les fosses nasales, les glandes de la peau, le cuir chevelu, les mains, la bouche, les dents et le périnée**[135].**

4.1.2.2-Dans l'environnement :

Le *S. aureus* est une bactérie qui est répandue sur la planète de façon ubiquitaire. Il possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux**[136].**

4.1.2.3- Dans les aliments et leur environnement de production :

La bactérie peut se retrouver dans les aliments comme par exemple, le lait, les produits laitiers ou la viande. La contamination des aliments peut être due principalement à la matière première qui est contaminée ou d'origine humaine lors de la fabrication et/ou le

conditionnement de l'aliment dans l'industrie agro-alimentaire Ces contaminations**[137].** sont souvent liées à un défaut d'hygiène du matériel de production ou de l'employé **[134].**

4. 1.3-Pouvoir pathogène :

Les Staphylocoques sont responsables chez l'homme, d'infections qui peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané ; elles peuvent aussi diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique avec un polymorphisme symptomatique extrême**[136].**

4.2-Bacillus cereus :

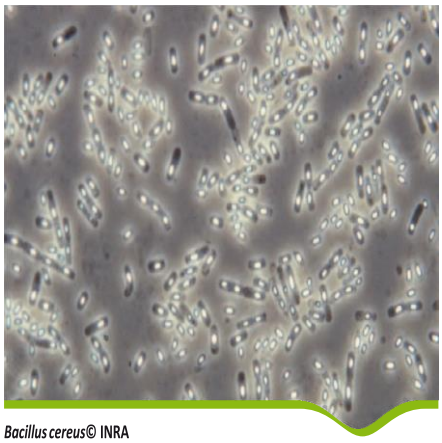


Figure 16:observation microscopique de bacillus cererus **.**



Figure 17: illustration de la bactérie **.**

4.2.1-Principales caractéristiques microbiologiques :

Bacillus cereus est responsable de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques et d'intoxinations [(1)] se traduisant par des symptômes émétiques. Il s'agit d'un bâtonnet à coloration Gram positive, sporulant et aéro-anaérobie facultatif.

Il fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées, souvent regroupées dans la littérature sous le terme « *Bacillus cereussensu lato* » au sein duquel on distingue traditionnellement : • *Bacillus cereussensu stricto* hémolytique [138].

4.2.2.l'habitats (Dans les aliments et leur environnement de production) :

Les spores de *B. cereus* sont présentes dans quasiment toutes les catégories d'aliment. Des produits secs ou déshydratés, tels que les épices, les herbes aromatiques, certains légumes, les céréales et les farines, sont fréquemment contaminés à des niveaux variables par *B. cereus*. Ces matières premières entrant dans la composition d'un produit fini, sont des sources potentielles de contamination. Par ailleurs, les spores de *B. cereus* possèdent de fortes

capacités d'adhésion aux surfaces en acier inoxydable et peuvent s'accumuler dans les équipements de transformation qui peuvent alors devenir des réservoirs de spores.

Les risques pour le consommateur sont le plus souvent liés à une multiplication de *B. cereus* lors de l'exposition des aliments à des températures inappropriées. Les aliments associés à des toxi-infections à *B. cereus* sont fréquemment, mais pas exclusivement, traités[139].

4.2.3.le pouvoire pathogène :

B. cereus est responsable d'intoxinations se traduisant par des symptômes émétiques et de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques . Les maladies à symptômes émétiques sont causées par l'ingestion d'une toxine, le céréulide, produite dans l'aliment au cours de la croissance de *B. cereus*. Les maladies à symptômes diarrhéiques seraient causées par l'ingestion de cellules et/ou de spores de *B. cereus*, suivie d'une production d'entérotoxines dans l'intestin. Toutefois, *B. cereus* produit plusieurs autres protéines à effet toxique *in vitro* ou sur modèles animaux[140].

4.3. Escherichia coli



Figure 18: illustration de la bacterie.



Figure 19 : observation microscopique.

Escherichia coli est l'agent le plus fréquent parmi les isolats cliniques provoquant une infection chez l'homme.on sait aujourd'hui que cette entérobactérie s'installe dans l'intestin des nouveaux nés rapidement après la naissance.Pendant un certain temps elle constitue l'élèment dominant de leur flore intestinale et elle reste présente chez l'adulte [141].

Escherichia coli(colibacille) est l'hote normal de l'intestin de l'homme et des animaux est une entérobactérie mobile commensale du tube digestif capable de fermenter le glucose et le lactose.Il représente l'éspèce dominante de la flore intestinale aérobie ou il participe à la barrière intestinal[142].

Est une bacille arrondi Gram- ne possèdant ni spore ni capsule elle se présente isolée ou en courte chainette et quelque cas sous forme de très long filament.pourvu de cils elle est généralement mobile grace à une ciliature péritriche cette mobillité est très variable selon le milieu ou la souche a été ensemencée [143].

4.3.1.Caractères biochimiques :

Quelques-uns des tests biochimiques les plus communément utilisés sont le type de fermentation formique, l'utilisation du lactose et du citrate, la production d'indole à partir de tryptophane, l'hydrolyse de l'urée et la production de sulfure d'hydrogène, pour identifier le genre *Escherichia*. Tableau 1 représente les principales caractéristiques *d'Escherichia coli.*

4.3.2. Caractères antigéniques :

L'étude de cette structure antigénique est très utile car certains sérotypes ont un pouvoir pathogène particulier. KAUFMAN a distingué trois variétés d'antigène O, H, K.

4.3.3.Pouvoir pathogène :

E.coli peut provoquer plusieurs infections :

1/infection urinaire

2/infection intestinale.

3/les septicémies méningite néo-nasals[144].

4.4.Pseudomonas aeruginosa :



Figure 20: illustration de la bactérie Pseudomonasaerogenosa.

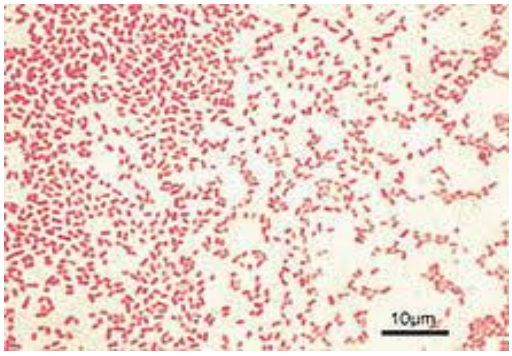


Figure 21: observation microscopique de

Autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique est une bactérie versatile et ubiquitaire dans l'environnement..Elle est communément trouvée dans le sol et l'eau(douces et marine)et sur les surface en contact avec ces milieux.p.aeruginosa est un bacille Gram- en forme de batonnet mobile grace à un flagelle polaire généralement unique dépourvu de spores

et de capsule.elle est constituée d'une membrane externe est une bichoucheasymétrique,elle pouce facilement en 24heures à 37cdans un milieux synthétique simple**[145].**

4.4.1.Pouvoire pathogène :

Pesudomonasaeruginosa est une bactérie opportuniste qui provoque rarement des infections chez les sujets en bonne santé**[146].**

Il s'agit alors :

-D'infestations massives par exemple chez les nageurs de piscines contaminées.

-ou d'inoculations traumatique directes dans un tissu ou une cavité (méningites ou ostéomyélited'inoculation).Lesprincipalesn pathologies causées par pseudomonasaeruginosa :

-pneumonie aigue.

-infection chronique de l'arbre bronchique.

-bactériémie et septicémie.

-otite et infection de plais **[146].**

Partie Pratique

1. Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Punica granatum.* La collecte de l'échantillon de l'écorce du fruit de *Punica granatum* a été effectuée en Algérie dans la région de Mostaganem au cours du mois d'octobre 2018. Il a ensuite été séché puis broyé, La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'humidité et de la lumière

Lieu de travaille dans laboratoire de l'univercité Dr yahya faras Médéa



Figure 22: Grenade; Ecorce degrenade et poudre d'écorce séchée.

2. Extraction et dosage des polyphenols :

2.1. Préparation de l'extrait d'écorces de la grenade (*Punica granatum*) :

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération par solvants organiques ; il s'agit du l'acétone. La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de la matière végétale à extraire. Dans notre cas 10 g de la poudre d'écorces est macérée avec le solvant acétone à 70%, à raison de 1/10 ml. L'extraction est effectuée sous agitation continue et à une température ambiante, pendant 24 heures. Après filtration sur un papier whatman, les filtrats sont additionnés et concentrés par un rotavaport.

Cette série d'extraction a permis d'obtenir un extrait d'acétone des écorces de *Punica granatum*, qui a été récupéré dans des flacons en verre stérilespuis conservés à 4° C jusqu'à utilisation.

2.2.Diagramme d'éxtraction:

Le protocole d'extraction est illustré par la figure :

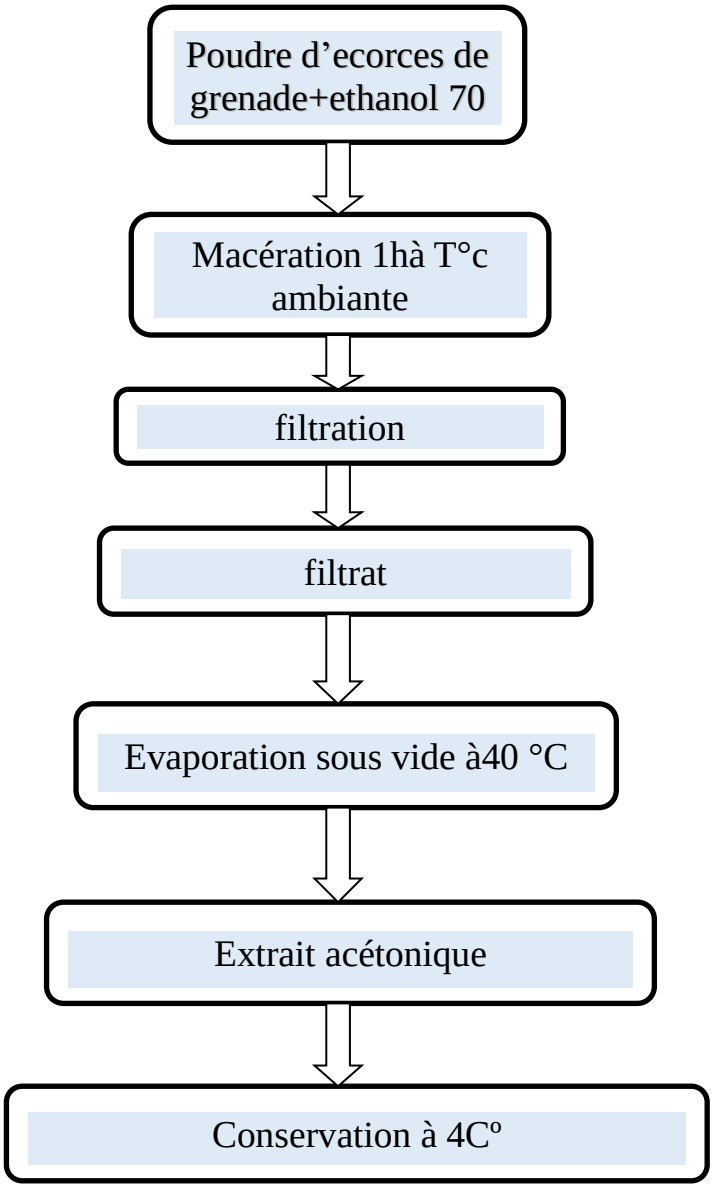


Figure 23: Protocole d'extraction des composés phénoliques de la poudre d'écorces deGrenade.



Figure 24 : extraction de l'extrait d'écorces de la grenade.



Figure 25 : Concentration des filtrats par le rotavaport.

2.3.Détermination du rendement :

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la poudre soumise à l'extraction.

R= (P1-P2) /P3

P1: poids du ballon après évaporation

P2: poids du ballon vide

P3: poids de la matière végétale de départ

2.4.Détermination de la teneur en polyphénols totaux :

2.4.1.Principe :

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin Cioclateu[147] Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Cioclateu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés **[148].**

2.4.2.Mode opératoire :

Dans un tube à essai, 5ml du réactif de Folin-Ciocalteu à 10% a été ajouté à1ml des différentes concentrations (0,062-0,125-0,25-0,5-1-2mg/ml) de l'extrait acétonique de *Punica granatum* ensuite la solution a été homogénéisée à l'aide d'un agitateur vortex. Après quelques minutes, 4ml de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) a été ajoutée, après la solution a été bien agitée afin d'obtenir une solution homogène.les solutions ont été incubées à l'ombre et à température ambiante pendant 1heure. L'absorbance a été mesurée à 765 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (de 10 à 50µg / ml). Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.



Figure 26 : Dosage des polyphénols totaux.

2.5. Détermination de la teneur en flavonoïdes :

2.5.1.Principe :

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Le chlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 420 nm.

2.5.2.Mode opératoire :

Une solution mère à une concentration de 2mg/ml d'extrait acétonique a été préparée dans de l'eau distillée. Un volume de 200 µl de nitrite de sodium $NaNO_2$ à 0,5 % a été mélangé avec 2 ml de chaque dilution de la solution mère. Après 6 min, 200 µl de chlorure d'aluminium AlCl3 à 1 % a été ajouté au mélange. Ensuite, 2 ml d'hydroxyde de sodium NaOH à 1 M a été ajouté. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme standard à différentes concentrations (0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 10 ; 20 et 40 µg/ml). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g d'extrait.



Figure 27: Dosage des flavonoïdes

3. Etude de l'activité antioxydante :

Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits des écorces de fruit de la plante*Punica granatum*, deux techniques ont été réalisées : en utilisant le radical 2.2'-diphényl-1picrylhydrazyl (DPPH) et la technique FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

3.1. Méthode DPPH (2.2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

3.1.1. Principe :

L'activité antiradicalaire des composés phénoliques contenus dans l' extraits préparés a été évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2.2'-diphényl-1pycrilhydrazyl) sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés) **[149].**

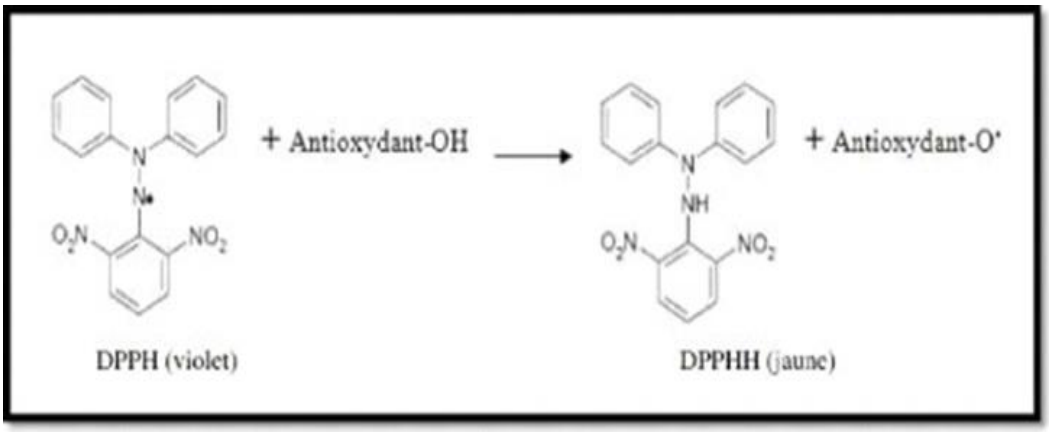


Figure 28 : la reduction de DPPH de sa forme radicalaire a sa forme, non radialaire.

3.1.2.Mode opératoire :

Une solution de 1mM de DPPH a été préparée dans le méthanol absolu, un volume de 2ml de chaque dilution de la solution mère (2mg /ml) a été mélangé avec 0,5 ml de la solution DPPH.

Après l'incubation à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nmcontre un blanc préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Toutes les mesures ont été répétées 3 fois. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons **[150].**

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) :

Pourcentage d'inhibition % = [(Abs contrôle – Abs test)/ Abs contrôle] x 100

Abs c : Absorbance du contrôle sans extrait après 30 min

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé après 30 min

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait nous a permis de calculer la concentration efficace (efficient concentration value: EC50). Cette dernière est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du DPPH à 50%.

3.2. Méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :

3.2.1. Principe :

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité de transfert des électrons et peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante. Dans cette technique, la couleur jaune de la solution change au vert et bleu selon le pouvoir réducteur de l'échantillon testé. Et, une absorbance élevée à 700 nm indique un pouvoir réducteur élevé**[151].**

3.2.2. Mode opératoire :

Une solution mère à une concentration de 2mg/ml d'extrait acétonique a été préparée dans de l'eau distillée, 1 ml de chaque dilution de la solution mére a été mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble a été incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite; 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% a été ajouté pour stopper la réaction. Après la centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes; 2,5ml du surnageant ont été mélangés avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure de fer à concentration 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Toutes les mesures ont été répétées 3 fois. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés **[152].**

4. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits de plante :

Pour notre étude, nous avons testé la sensibilité de quatre souches bactériennes de référence provenant de l'Institut Pasteur d'Alger vis-à-vis des agents antimicrobiens standards biologiques (extraits végétaux). Il s'agit de deux souches bactériennes Gram négatives et deuxGram positive connues pour être responsables d'infections nosocomiales **(tableau**

n°2).Afin de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits étudiés in vitro, nous avons choisi la méthode des disques sur milieu de Mueller-Hinton gélosé. L'identité des souches est représentée dans le tableau ci-dessous .

Tableau n°2 : Liste des souches bactériennes testées :

Souche	**Code**	**Gram**	**Source**
Bacillus cereus	ATCC 10876	positive	Institut Pasteur d'Alger
Staphylococcus aureus	ATCC 29213	positive	
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	négative	
Escherichia coli	ATCC 25922	négative	

ATCC: American Type Culture Collection.

4.1. Principe :

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche étudiée sera qualifiée de sensible, intermédiaire ou résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester [153].

4.2. Protocole expérimental :

4.2.1.Les souches microbiennes :

Les souches utilisées pour déceler l'activité antimicrobienne des extraits d'écorces de grenades sont des souches microbiennes de référence.

4.2.2. Repiquage des espèces bactériennes et préparation d'inoculum :

Les souches bactériennes ont été enrichies dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures. Puis un aliquote de chaque suspension bactérienne a été ensemencé en stries dans desboites de Pétri préalablement coulées de gélose nutritive.Après l'incubation, deux ou trois colonies, bien isolées, ont été prélevées et mise en culture dans 10ml de bouillon nutritif. Après 18 heures d'incubation à 37°C, nous avonseffectué des dilutions de la suspension afin

de standardiser l'inoculum. Ce dernier doit êtreajusté à une densité optique entre 0,08-0,1 à 600nm soit environ 10^8 UFC/mlafin d'avoir des suspensions bactériennes ayant une turbidité voisine à celle de 0.5 McFarland.

4.2.3. Préparation des solutions :

Une série de différentes concentrations de 5, 10, 20 et 40mg/ ml a été préparée dans de l'eau distillée stérile à partir de l'extrait acétonique de *Punica granatum*.

4.2.4. Méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques) :

Des boites de pétri contenant le milieu Mueller Hinton, ont été ensemencées par un volume de 50µl de chaque suspension bactérienne, dont la densité optique a été ajustée à 0,08-0,1 à 600 nm pour toutes les souches bactériennes testées, l'ensemencement s'effectue par étalement à l'aide d'un râteau stérile de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. Sur la surface du milieu gélosé inoculée préalablement par les différentes souches testées, des disques stériles imprégnés de 5, 10, 20 et 40 mg/ml d'extrait acétonique, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Après un temps de repos de 30 min, les boîtes Pétri ensemencées ont été incubées 24 à 48 h à 30 °C. L'eau distillée stérile a été utilisé comme témoin négatif. Chaque essai a été répété trois fois. Après l'incubation, la lecture de l'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition et exprimée en mm.

5.Analyse statistique :

Les données expérimentales du dosage et l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues ont été exprimés par une moyenne avec 3 répétitions. Les coefficients de corrélation des courbes ont été déterminés en utilisant le programme Excel 2007 ainsi que les histogrammes et les courbes.

1. Rendement d'extraction:

La préparation des extraits à partir des écorces de la grenade a été effectuée par l'acétone.

Cette extraction a permis d'obtenir un extrait brut.

Les rendements des extractions sont calculés suivant la formule ci-dessous:

R= (P1-P2) /P3

P1: poids du ballon après évaporation

P2: poids du ballon vide

P3: poids de la matière végétale de départ

Les résultats des rendements d'extraction sont présentés dans la figure ci-dessous.

Tableau 03:Aspect,couleur et pourcentage du rendement de l'extrait brut d'écorce de la grenade.

Extrait	**Aspect**	**Couleur**	**Rendement %**
Acétone	Pâte collante	Brune	56,90%

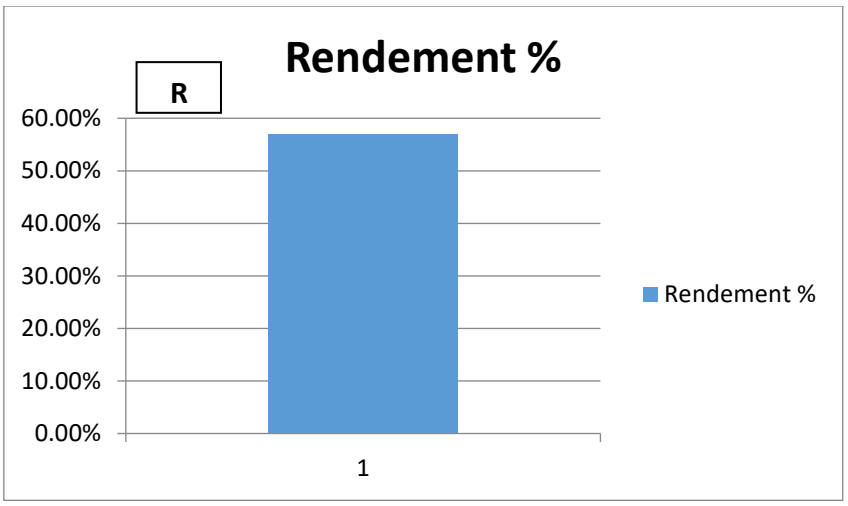


Figure 29: *Rendement d'extraction*

Les résultats montrent que l'extrait acétonique d' écorce de *Punica granatum* L. a donné un bon rendement d'extraction (56.9 %). (Figure 29)

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **[154].**

[154] ont extrait les antioxydants à partir de la peau et de la pulpe du fruit de grenadier en utilisant le méthanol, l'acétone et l'eau ; Ils ont constaté que le méthanol a donné le meilleur rendement.

La polarité d'un solvant en dehors du moment dipolaire, la polarisabilité et la liaison d'hydrogène déterminent quel type de composés est capable de dissoudre **[155].**

2.Etude quantitative des extraits :

2.1.Dosage des polyphénols totaux(PPT):

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 765 nm.

La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

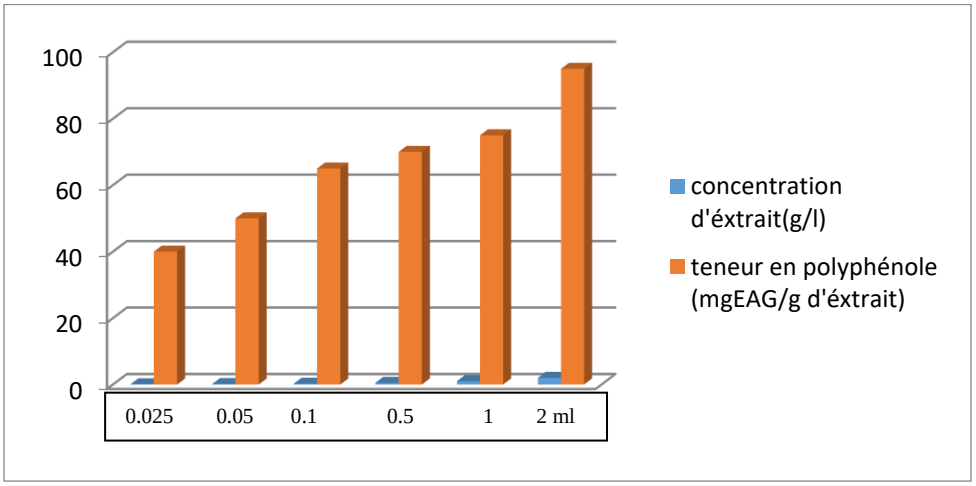


Figure 30: *Teneurs des polyphénols totaux des extraits dans les défferents consentrations*

Les résultats révèlent que le taux des polyphénols totaux augmente avec l'augmentation des différentes concentrations d'extrait de grenade. A la plus haute concentration 2ml nous avons obtenu une teneur en polyphénols de 95 mgEAG/g

La grenade est connue pour être l'un des fruits les plus riches en polyphénols. En particulier, l'écorce de fruits contient des quantités élevées de composés phénoliques, tels que les acides puniques, les acides galliques, ellagiques et les anthocyanes **[156].** Des études ont également rapporté que le contenu phénolique des écorces de grenade était 10 fois plus élevé (249,4 mg / g) que celui trouvé dans la pulpe (24,4 mg / g) **[157].**

[162] rapportent une teneur en phénols totaux de 216,9 mg EAG/g MS pour les écorces de grenades tunisiennes et [163] une teneur de 249,4 mgEAG/g MS.

Les écorces sont plus riches en polyphénols totaux que les graines [160].

En générale, les composés phénoliques dans les plantes sont des composés polaires, qui sont souvent extrait avec des solvants polaires tels que l'hydro-acétone et le méthanol. Les profiles phénoliques différeraient également quand différents solvants sont utilisés **[161].**

Selon des études antérieures, les différences dans la composition des composés phénoliques pourraient être attribuées à de nombreux facteurs, y compris la variété, la maturité des fruits les pratiques agricoles, l'aire de culture, la saison de récolte des fruits, les conditions climatiques et les conditions de stockage des fruits de grenade **[162].**

2.2.Dosage des flavonoïdes totaux (FVT):

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), la courbe d'étalonnage est celle de la quercétine, l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 510 nm.

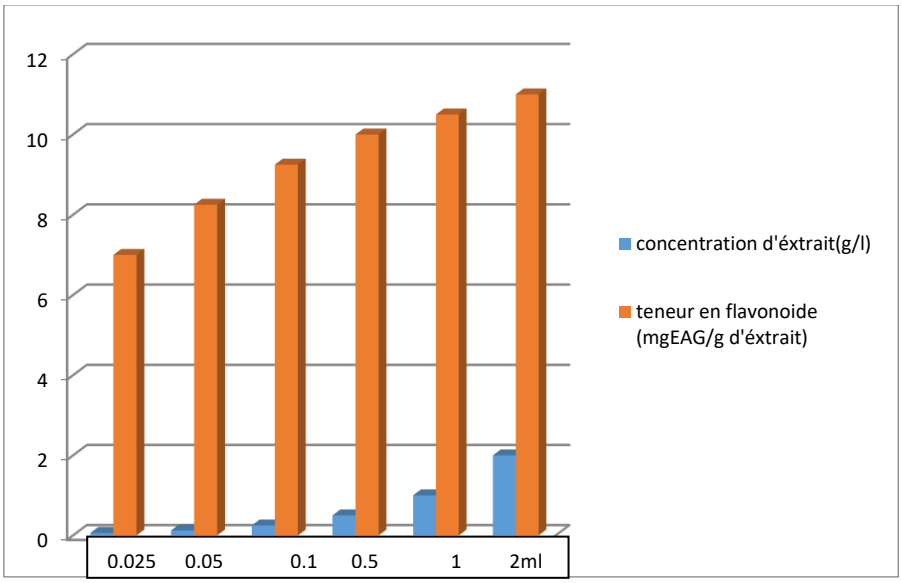


Figure 31: *Teneurs en flavonoïdes totaux dans l es extraits dans les défférents consentration.*

Les résultats révèlent que la teneur en flavonoïdes augmente avec l'augmentation des concentrations des extraits de *Punica granatum*.A la plus haute concentration 2ml nous avons obtenu une teneu ren flavonoïdes de 11mgEC/g

[163] indiquent que les flavonoïdes et les tanins sont les composés les plus abondants dans l'écorce de cette plante.

Comme indiqué par **[164]**, les extraits aqueux des écorces de différents cultivars égyptiens ont des teneurs en flavonoïdes variables, allant de 21.72 – 34.28 mg ER/g. Ce résultat est nettement supérieur à la valeur obtenue.

[165] ont montré que la composition de l'extrait méthanolique en flavonoïdes est de 56.4 mg ER/g. Ce qui est nettement supérieur à la valeur obtenue.

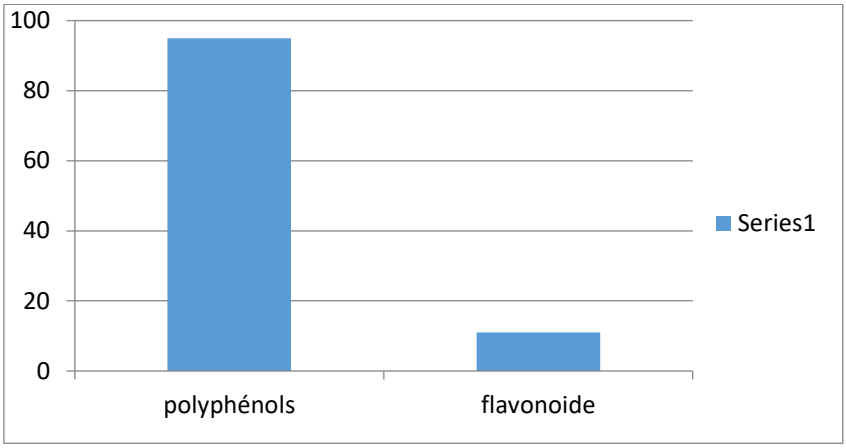


Figure 32 : Teneur des extraits en Flavnoides et polyphénols à une concentration de 2 mg/ml

La figure représente quantification de la composition totale en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait acétonique des écorces de *Punica granatum* L.

Les résultats montrent que le taux en polyphénols totaux, est plus élevé dans l'extrait acétonique par rapport aux Flavnoides.

3.Evaluation de l'activité antioxydante :

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits de grenade *Punica granatum* L.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH· en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations de chaque extrait. Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente.

3.1.Méthode du radical libre DPPH :

L'activité antiradicalaire est calculée par la méthode du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), cette méthode est fréquemment utilisée pour sa simplicité. Elle est basée sur la réduction d"une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui

donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés [166] **.**

Dans ce présent travail, nous avons comparé l'activité antioxydante des extraits de grenadier à celle des antioxydants de référence synthétique (l'acide ascorbique (Vitamine C).

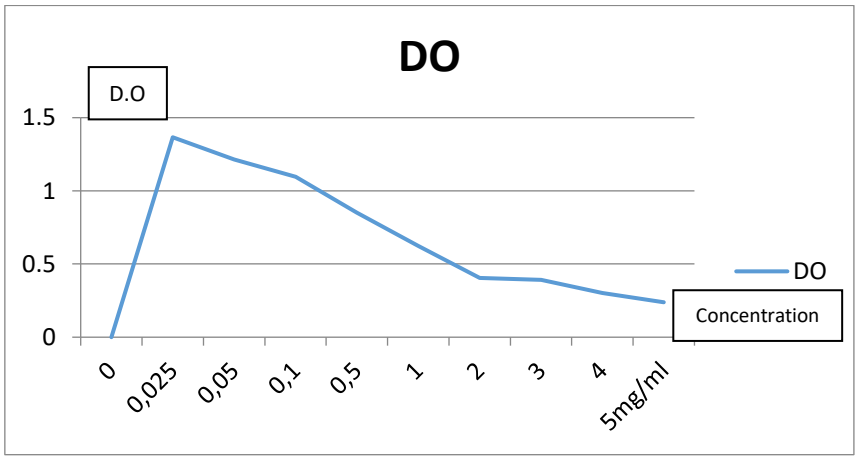


Figure 33: Pouvoir antioxydant du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits.

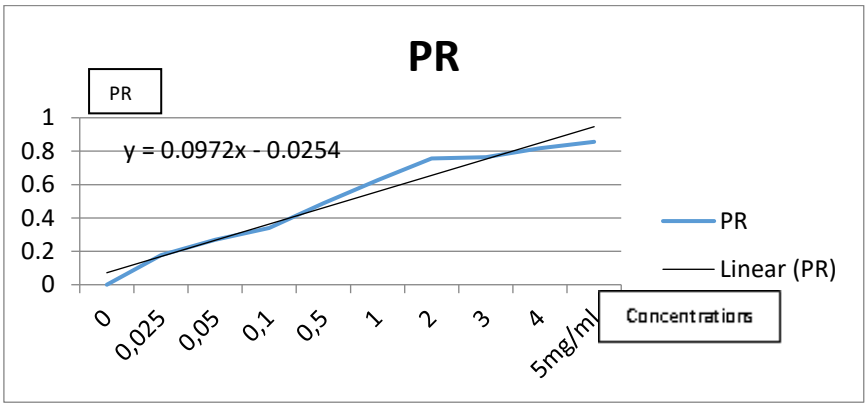


Figure 34 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits

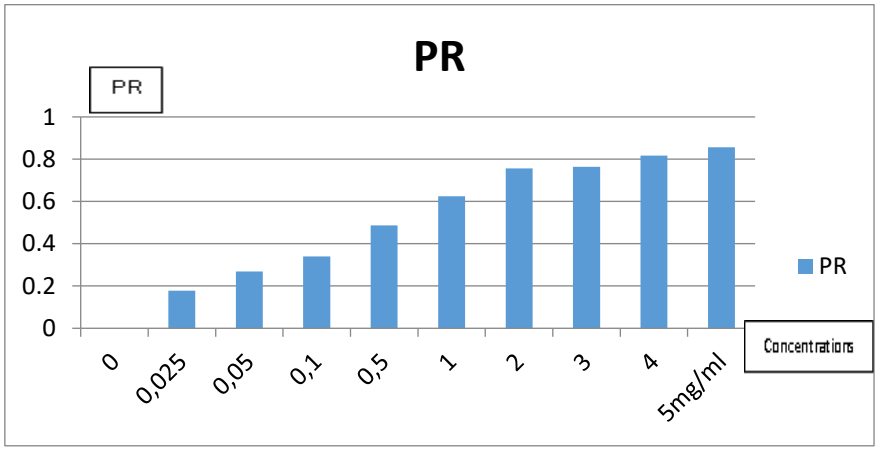


Figure 35 : Pouvoir antioxydant des extraits d'écorces de la grenade

Les figures ci-dessus illustrent l'efficacité des extraits de *Punica granatum* à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

D'après les résultats, l'évolution de l'activité anti-radicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.

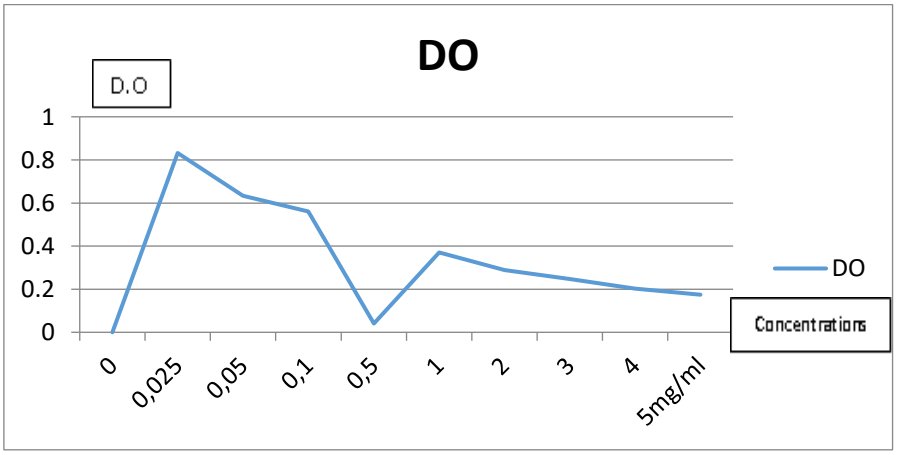


Figure 36 : Pouvoir antioxydant du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

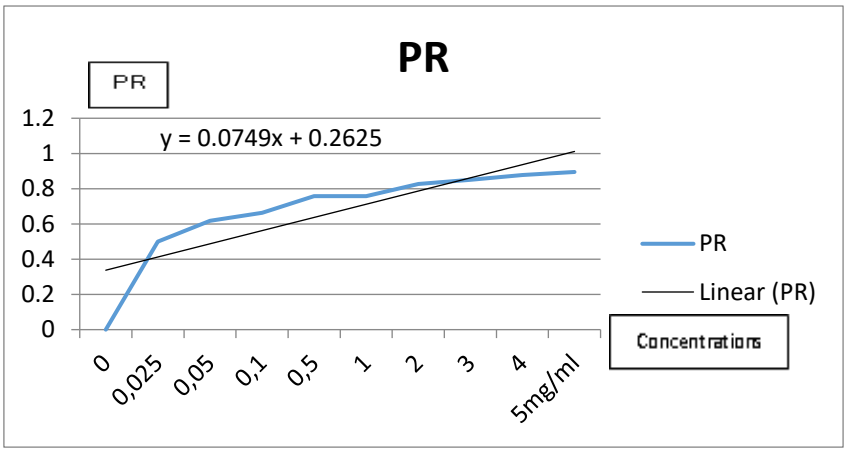


Figure 37: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

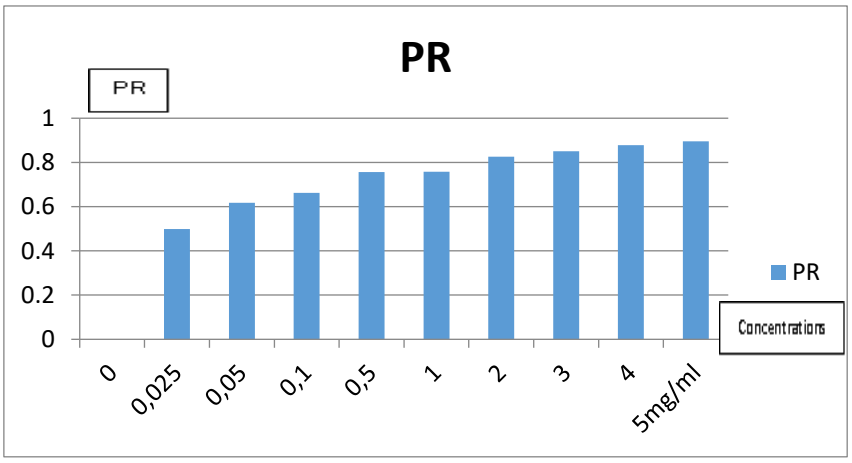


Figure 38 : Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique.

D'après les résultats présentés dans les figuresN(35,36,37,38,39,40) nous avons constaté que l'extrait acétonique et l'acide ascorbique ont montré une bonne activité antioxydante dans le test de DPPH (bon pouvoir réducteur) mais cette activité antioxydante était élevée dans l'acide ascorbique par rapport à l'extrait acétonique, avec des valeurs de 89.5% et 85.6% respectivement

[167] ont rapporté que l'extrait des écorces de la grenade présent une forte activité antioxydante dans le test de DPPH.

Les écorces sont plus riches en composés phénoliques que les graines, ce qui fait que leurs activités antiradicalaires soient supérieures que celles des graines [168].

[169] ont conclut que l'extraction sélective d'antioxydants provenant de sources naturelles par un solvant approprié est très importante dans l'obtention d'extraits à forte activité antioxydante. Selon **[156],** les antioxydants à base de plantes sont extraits des matières

premières ou des déchets de l'industrie alimentaire par les solvants organiques tels que le méthanol, l'acétone et l'éther diéthylique. Ils rajoutent que le méthanol est un extracteur efficace pour une large gamme de polyphénols, et fréquemment utilisé à l'échelle de laboratoire et à l'échelle industrielle. Sachant qu'il est facilement accessible et à bon marché.
[162] ont rapporté une augmentation significative du pouvoir réducteur de l'extrait d'écorce de grenade avec l'augmentation de la concentration de 50 à 400ppm.

Dans une autre étude menée par **[170],** l'écorce de grenade présentait une activité antioxydante très puissante.

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC50 ou concentration inhibitrice de 50% qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH·

Tableau04 :valeur des IC50 des extraits acétonique et de la vitamine C :

	éxtrait acétonique	Acide ascorbique
IC50(mg/ml)	4.8	3.2

La valeur d'IC50 est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (Activité antioxydante I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu.
Plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité anti-radicalaire d'un composé est appréciable. L'analyse du tableau , montre que les écorcse de *Punica granatum* présente une valeur moyen d'IC50 prés de celle de la vitamine C. Cela signifie que son pouvoir antioxydant est puissant.
[159]rapportent une IC50 de 8,33 µg/ml pour des extraits méthanoliques des écorces de grenade. Cette forte activité antioxydante est liée à la forte concentration en composés phénoliques.

3.2. Méthode FRAP(Ferric reducing antioxidant power) :

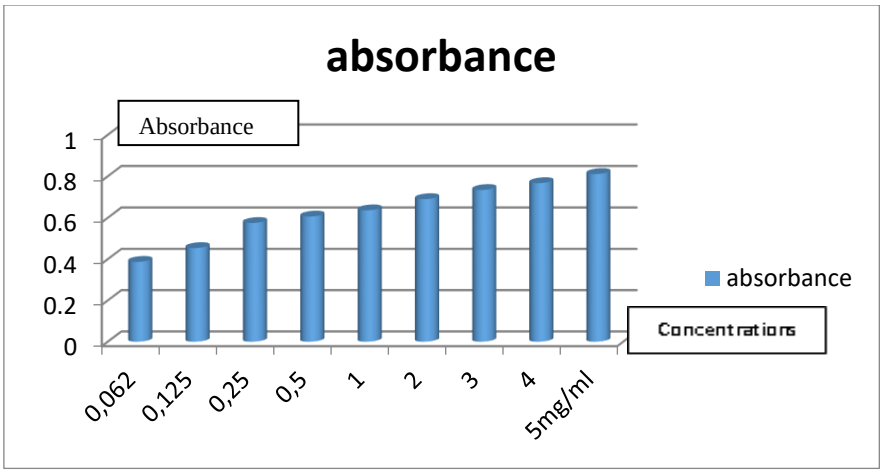


Figure 39: Pouvoir réducteur de l' extrait acétonique de *Punica granatum* testé par la méthode FRAP

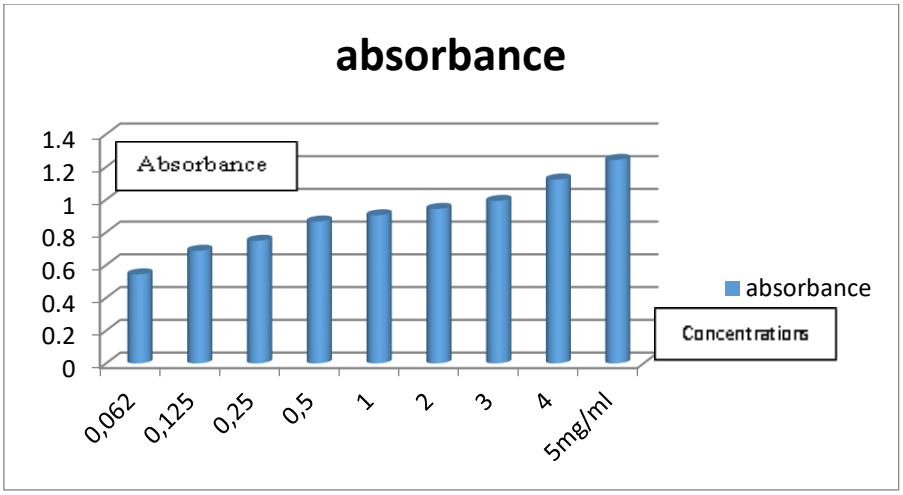


Figure 40: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP

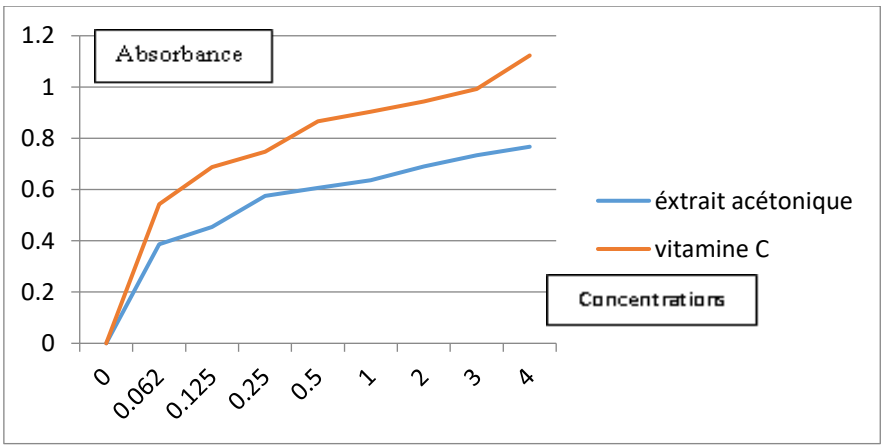


Figure 41 :Pouvoir réducteur des extraits de *Punica granatum* et l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP.

L'augmentation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP correspond à une grande capacité de réduction du Fe3+. Cela se traduit par l'augmentation de l'absorbance à 700nm.
La figure indique clairement que le pouvoir réducteur sur le fer ferrique Fe+++ en fer ferreux Fe++ varie linéairement avec la variation de la concentration en extrait.
A partir des résultats rapportés dans la(figure 45) nous avons remarqué une augmentation de l'activité du l'éxtrait acétonique des écorces de *Punica granatum* L. avec l'augmentation de la concentration. A la plus haute concentration 5mg/ml nous avons obtenu une valeur de densité optique de 811 à 700nm.
Nose résultats sont similaires avec les études de **[156]** qui ont rapporté une augmentation significative du pouvoir réducteur de l'extrait d'écorce de grenade avec l'augmentation de la concentration de 50 à 400ppm.
L'étude actuelle a prouvé que les écorces de *Punica granatum* est une source riche d'antioxydants alimentaires.
Le test FRAP traite les antioxydants contenus dans les échantillons comme réducteurs dans une réaction colorimétrique redox et la valeur reflète le pouvoir réducteur des antioxydants **[171].**

Cette méthode a été utilisée fréquemment pour une évaluation rapide de la capacité antioxydante totale de divers aliments et boissons **[172]**, les flavonoïdes **[173],** et les différents extraits de plantes contenant des polysaccharides **[174].**

Le pouvoir réducteur d'un composé sert d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle **[175]**

[176] ont étudié l'activité antioxydante des extraits d'écorces de *Punica granatum* en utilisant deux méthodes ; la méthode FRAP et le piégeage du radical libre DPPH. Ils indiquent que l'activité antioxydante par le test de DPPH de l'extrait méthanolique a été considérablement élevée, à mesure que la concentration augmentait de 12.5 à 50 ppm. Et que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait méthanolique à 50 ppm était de 99.3 % tandis que celui de l'extrait aqueux était de 75.4%.

Dans une autre étude menée par **[166],** l'écorce de grenade présentait une activité antioxydante très puissante. Dans une gamme de concentrations (5, 10, 15, 20 et 25 mg/ml) des extraits organiques d'écorces ; le méthanol a donné un pourcentage d'inhibition de 85.90% à 51.21% par rapport à la gamme de concentrations. A titre indicatif, la valeur d'IC50 trouvée pour l'extrait méthanolique était de l'ordre de 20mg/ml.

Selon **[177]** indiquent que l'effet réducteur des extraits de grenade semble être dû à la présence des polyphénols qui peuvent agir d'une manière similaire que les réductones par donation d'électrons.

4.Activité antimicrobiennes:

4.1.Effet des extraits de l'écorce de la grenade sur la croissance des souches (la methode de disques) :

Tableau 05 : Activité antibactérienne des extraits d'écorces de grenades exprimée en diamètre d'inhibition (mm)

Les boites / les bactéries	BOITE 1				BOITE 2				BOITE 3			
Les concentrations mg/ml	40	20	10	5	40	20	10	5	40	20	10	5
Escherichia coli	24	14	12	/	25	14	12	/	24	13	12	/
Staphylococcus aureus	13	12	11	10	14	15	10	/	13	12	11	11
Bacillus .cereus	27	14	12	10	28	16	13	10	27	15	13	10
Pseudomonas aeruginosa	17	16	14	12	18	16	15	11	17	15	14	12

- L'eau distillé : témoin (-)

4.2.Les résultats du test de l'activité antibactérienne :

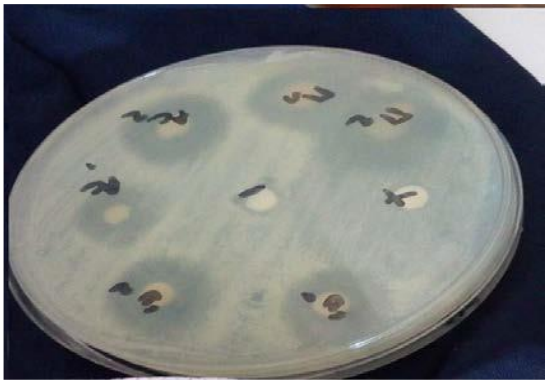


Figure 42 :*Staphylococcus aureus* ATCC29213



Figure 43 : *Bacillus cereus*ATCC10876



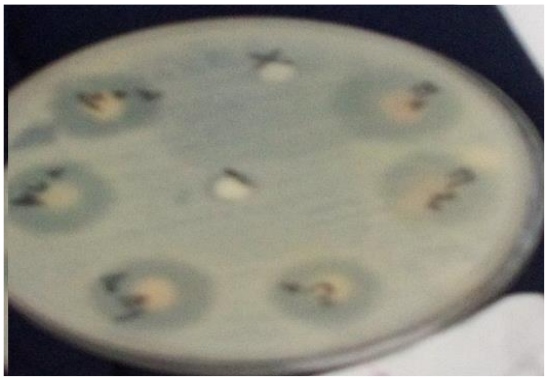


Figure 44:*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 **Figure 45:** *Escherichia coli*ATCC25922

La croissance des différents germes utilisés dans cette étude (*Escherichia coli,Bacillus cereus, Staphylococcus aureus*.et *Pseudomonas aeruginosa* a été testée en présence d'extrait acétonique de *Punica granatum*, avec des concentrations de 5, 10, 20 et 40 mg/ml .

A partir des résultats illustrés sur le tableau ci-dessus nous avons constaté que les deux souches *E. coli* et *B. cereus* sont les plus sensibles aux différentes concentrations de l'extrait acétonique de *Punica granatum* avec des diamètres d'inhibition de 25mm et 28mm à une concentration de 40mg/ml. Quant aux souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* nous avons pu noter une meilleure résistance aux différentes concentrations de l'extrait végétal étudié avec des diamètres d'inhibition de 14mm et 18mm à une concentration de 40mg/ml. D'après les résultats de l'activité antibactérienne obtenus nous avons observé que le diamètre de la zone d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait acétonique de *Punica granatum* De plus, les résultats obtenus ont montré que le pouvoir antibactérien se diffère d'une souche à une autre, sachant que les mêmes concentrations de l'extrait acétonique ont été appliquées pour les quatre (4) souches testées. Nous avons constaté que l'inhibition de la croissance bactérienne dépend de trois facteurs : la bactérie utilisée, la nature et la concentration du produit testé.

Les résultats montrent que la majorité des souches bactériennes étudiées sont sensibles aux extraits de l'écorce de la grenade. Sauf *Staphylococcus aureus* qui est plus au moins résistante à ces derniers.

L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance microbienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires. **[178]**.
L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés [179].

[180] a rapporté que les différentes classes de polyphénols essentiellement 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.

L'écorce du fruit de *Punica granatum* possède donc, *in vitro*, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes [181].

Beaucoup de groupes de recherches ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industries pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle [181].

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Dans notre travail, différents aspects d'écorces de la grenade ont été étudiés: quelques propriétés phytochimiques, activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'extrait acétonique de *Punicagranatum.*

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 95 mg (équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait) dans les extraits acétonique.

Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$, leurs teneurs est de 11 mg EQ/g Q (équivalent de quercitine par gramme d'extrait).

L'activité antioxydante des différents extraits d'écorces de la grenade a été évaluée par la méthode de réduction du radical libre DPPH et la méthode FRAP.

. D'après les résultats présentés nous avons constaté que l'extrait acétonique et l'acide ascorbique ont montré une bonne activité antioxydante dans le test de DPPH (bon pouvoir réducteur) mais cette activité antioxydante était élevée dans l'acide ascorbique par rapport à l'extrait acétonique, avec des valeurs de 89.5% et 85.6% respectivement. C'est un activité dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.les résultats montre aussi que les écorcse de *Punica granatum* présente une valeur moyen d'IC50 (4.8mg/ml) prés de celle de la vitamine C. Cela signifie que son pouvoir antioxydant est puissant.

A partir les résultats rapportés par la méthode FRAP nous avons remarqué une augmentation de l'activité du l'éxtrait acétonique des écorces de *Punica granatum* L. avec l'augmentation de la concentration. A la plus haute concentration 5mg/ml nous avons obtenu une valeur de densité optique de 811 à 700nm

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur 4 souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disques, Les résultats indiquent que l'extrait acétonique de

*Punicagranatum*possède une activité antibactérienne sur toutes les souches bactériennnes testées

La zone d'inibition la plus impotante a été observée avec l'extrait acétonique a une concentration de 40 mg/ml vis-à-vis a la souche de *bacillus*, la rendant ainsi la souche la plus sensible aux extrait acétonique d'écorce de la genade. D'après les résultats de l'activité antibactérienne obtenus nous avons observé que le diamètre de la zone d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait acétonique de *Punica granatum* De plus, les résultats obtenus ont montré que le pouvoir antibactérien se diffère d'une souche à une autre, sachant que les mêmes concentrations de l'extrait acétonique ont été appliquées pour les quatre (4) souches testées. Nous avons constaté que l'inhibition de la croissance bactérienne dépend de trois facteurs : la bactérie utilisée, la nature et la concentration du produit testé.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans l'extrait en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de ce fruit. L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits d'écorce de la grenade.

Les références

Les références

[1] Wald, E. (2009). Le grenadier Punicagranatum: Plante historique et evolution thérapeutiquerécentes. Universite Henri Poincare.Thése.158p

[2] SOFOWORA A., 2010. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique**.** Karthala**,** Paris, 384p

[3]SMALL E. et CATLING P.M., 2000. Les cultures médicinales canadiennes. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario), Canada. 281p.

[4]Pascual J.T., Gonzalez M.S., Muriel M.R and Bellid I.S. (1984). Phenolic derivatives fromPunica geanatum l23 (8):1819-1821

[5]**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 pp 121- 216.

[6] Bahorun, T.(1997). Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and Agricultural ResearchCouncil, Réduit, Mauritius , p 83.

[7]Malagas, D., 1992. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT - Karthala. p. 232.

[8]Medic-Sanic, M., Jasprica, I., Smolcic-Bubalo, A., Mornar, A., 2004.Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids.Croatica chemica acta.361-366 p.

[9]Meddleton, E., Kardasnami, J.C., 1993. The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London, 617-652 p **.**

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

[11]Harbone, J.B., Grayer, R.J., 1988. The flavonoids, Advances. In: research since 1980. Harboirne J B, Chapman and Hall, London, 1-20 p.

[12]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 **.**

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

[14] Ben Abdennebi, M. A .)2012). Le grenadier tunisien (Punicagranatum) 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. Mémoire., Fac. Med. Tunis, 82p.

[15] Spichiger ,R.E et Savolainen ,V.(2005). Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales (Troisième édition). Presses polytechniques et universitaires romandes (EDS), 413 p.

[16] Sarkhosh, A. Zamani. Z. Fatahi, R. Ebadi, A. (2006(.RAPD markers reveal polymer phismamongsome Iranianpomegranate (Punicagranatum L.) genotypes. Sci. Hortic. 111(1), 24-29.

[17] Melgarejo, **P**.(1993). Seleccion y tipificacion varietal de granado (PunicagranatumL.) [Ph.D. thesis] Valencia. Spain: Univ. Politecnica de Valencia (UPV).

[18] Flora von Deutschland, **O.W.T. Schweiz**, O.U.D. **(1885(.**Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera.Germany.

[19] Wald, E. (2009). Le grenadier Punicagranatum : Plante historique et evolution thérapeutiquerécentes. Universite Henri Poincare.Thése.158p.

[20] Cazin ,F.J.(1868). Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées. De l'envol (EDS) 1189 p.

[21] Garnier, G et Bezanger-Bauqeuesne, L.(1961). Ressources médicinales de la flore française. Tome II. Vigot Frères (EDS). 1511p.

[22] Paris ,R.R. Moysz, H. (1981). Matière médicale. Collection de précis de pharmacie. 2° édition. Tome II. Masson (EDS), 518 p

[23] Lanskye ,P. Newman , R. A.(2007(. Punica granatum (pomegranate) and itspotential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of ethnopharmacology.N°109. 206p.

[24] Fournier, P.(1948). Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tome II. Paul Lechevalier (EDS), 504 p.

[25]Koechlin-Ramonatox C., 2006. Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition clinique et métabolisme, vol. 20, no 4, p. 165-177.

[26] Swain SD, Rohn TT, Quinn MT., 2002. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. Antioxid Redox Signal, vol 4, no 1, p. 69-83.

[27]Li X., Wasila H., Liu L., Yuan T., Gao Z., Zhao, B., Ahmad I., 2015. Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis.Food chemistry, vol 175, p. 575-584.

[27]Dasgupta, A. and Klein, K., 2014. Antioxidants in food, vitamins and supplements: Prevention and treatment of disease. Academic Press.

[28] Kehrer, J.P. and Klotz, L.O., 2015. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. Critical reviews in toxicology, vol. 45, no 9, p. 765-798. Doi: https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1074159

[29]Burton G.J. and Jauniaux E., 2011. Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, vol.25, no 3, p. 287-299. Doi: http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016

[30]Dasgupta, A. and Klein, K., 2014. Antioxidants in food, vitamins and supplements: Prevention and treatment of disease. Academic Press

[30]Halliwell B. and Gutteridge J.M., 2015. Free radicals in biology and medicine.Oxford University Press, USA.

[31] TACCHINI P., 2014. Les radicaux libres et l'oxydation. EDEL THERAPEUTICS, PSE-B, 1015 LAUSANNE.

[31] HALENG J., PINCEMAIL J., DEFRAIGN J.O., CHARLIER C., CHAPELLE J.P., 2007. Le stress oxydant. Rev med liege, (62): 10: 628-638.

[32]ANDRE J., 2005. Vascular Organization of Angiosperms: A New Vision, Science Publishers, France, 140p.

[33]BONNEFONT-ROUSSELOT D., PEYNET J., BEAUDEUX J.L., THEROND P., LEGRAND A., DELATTRE J., 2002. Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. Nutrition clinique et métabolisme, (16): 260-267.

[34] FAVIER A., 2003. Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 115p.

[35]LACRAZ G., 2009. Relation entre stress oxydant et homéostasie glucidique au cours de diabète de type 2: Adaptation de la cellule β pancréatique. Thèse doctorat en Physiologie et Physiopathologie. Université de Paris.

[36]AHSAH H., ALI A., ALI R., 2003. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. Clinical and experimental immunology, 131(3): 398-404.

[36]LEE J., KOON N., MIN D.B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive reviews in food science and food safety, 3(1): 21-33.

[37]GUZIC T.J., KORBUT R., ADAMEK-GVZIK T., 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. Journal of physiology and pharmacology, 54(4): 469-487.

[38]GEOPTAR A.R., SCHEERENS M., VERMEULEN N.P., 1995. Oxygen and venobiotic reductase activities of cytochrome P 450. Critical reviews in toxicology, (25): 25-65.

[39]BECKMAN K.B. et AMES B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. Physiological reviews, 78(2): 547-581.

[40]RICHE D. et CHOSE D., 2008. Micronutrition, santé et performance. Groupe de Boeck et Larcier, Paris, 372p.

[41]HALENG J., PINCEMAIL J., DEFRAIGN J.O., CHARLIER C., CHAPELLE J.P., 2007. Le stress oxydant. Rev med liege, (62): 10: 628-638

[42]Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension

des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique : 111-112

[43]Pincemail J, Haleng J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. (2007). Le stress oxydant. 62(10): 628-38

[44]Averbeck D. (2006). Lésions radio-induites de l'ADN : Mécanisme de réparation, Inhibiteurs de la réparation.Centre universitaire d'Orsay.

[45] Barnoud D, Cano N, Schneider SM, Vasson MP, Hasselmann M, Leverve X. (2007). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer, troisième édition. Paris : 241-242

[46]Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and

antioxidants in oxidative modification of LDL, Free Rad. Biol. Med 13 p:341

[47]Aiyegoro O.A., Okoh A.I., 2009. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of Helichrysum pedunculatum. International journal of molecular sciences, vol 10, no 11, pp. 4990-5001.

[48]Al-Halabi R., Al-Bakri I., Al-Joubbeh M., 2013. Chemical Changes and Antioxidant Activity in Arils Juice of two Syrian Pomegranate Accessions during Fruit Maturation.International Journal of ChemiTech Research. CODEN (USA): IJCRGG, vol 5, no 6, pp.

2769-2781.

[49]Akhavan H., Barzegar M., Weidlich H., Zimmermann B.F., 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars depend on extraction. Journal of Chemistry, vol 2015, pp.1-7.

[50]Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine, vol 20, no 7, p. 933-956. Doi :https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9

[51]Sies H., Stahl W., 1995. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants.The American journal of clinical nutrition, vol 62, no 6, p. 1315S-1321S.Doi: https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1315S

[52]Nagar A., Sharma V., Chhipa A.S., 2017. Role of antioxidants in biological system.Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences, vol 6, no 1, p. 7-12.

[53]Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews, vol 4, no 8, pp.118.

[54]Krinsky N.I., 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol 200, no 2, p. 248–54

[55]Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., 2008. Improving the health-promoting

properties of fruit and vegetable products. Technology and Nutrition

No. 157. CEBAS (CSIC). Spain

[56]Gil, M. I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A.,2000. Antioxidant capacity of pomegranate juice and its relationship

with phenolic composition and processing. J. Agric. Food Chem. 48 (10),

4581-4589.

[57] Mena, P., Garcia-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D., Bartual, J.,

Saura, D., Marti, N., 2011. Phytochemical characterisation for industrial

use of pomegranate (Punica granatum L.) cultivars grown in Spain. J. Sci.

Food Agric. 91, 1893–1906

[58]Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I., 2009. Pomegranate: botany.

Horticulture.breeding. Horticultural Reviews. 35, 127-191.

[59]Lansky, E.P., Newman, R. A., 2007. Punica granatum (pomegranate) and its

potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J.

ethnopharm. N°109.Pages 177-206.

[60]Shah M., Shah S., Patel M., 2011. Review On: The Aspects of Punica granatum. Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research, vol 1, no 3, p. 154-159

[60]Chadli R., Bouzid A., Bouzid Kh, Nader H., 2015. Bactericidal effect of aqueous extracts of the bark of the pomegranate (Punica granatum L.) on Bacteria. European Journal of Molecular Biotechnology, vol 7, no 1, p.4-11.

[61]Holland D., Hatib K., Bar-Ya'akov I., 2009. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. Horticultural Reviews, vol 35, p.127- 191.

[61] Smith R.E., 2014. Pomegranate: Botany, Postharvest Treatment, Biochemical Composition and Health Effects. In: Food and Beverage Composition and Health. Nova Science Publisher, p. 1- 173.

[62]Ruis A. R., 2015. Pomegranate and the Mediation of Balance in Early Medicine. Gastronomica: The Journal of Critical Food Studies, vol 15, no 1, p. 22-33. DOI: 10.1525/gfc.2015.15.1.22

[63]Stover E., Mercure E.W., 2007. The pomegranate: A new look at the fruit of paradise. Hortscience.vol 42, no 5, p.1088-1092.

[63] Holland D., Hatib K., Bar-Ya'akov I., 2009. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. Horticultural Reviews, vol 35, p.127- 191

[63]Haque N., Sofi G., Ali W., Rashid M., Itrat M., 2015. A comprehensive rrevieu of phytochemical and pharmacological profile of Anar (Punica granatum Linn): A heaven's fruit. Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine, vol 1, no 1, p. 22-26

[64]Ashton R., 2006. The Incredible Pomegranate: Plant and Fruit. Third Millennium Publishing, p. 1-118

[65]. **Wald E., 2009.** Le grenadier (Punica granatum L.): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Doctorat de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy, 1

[66]Ben Abdennebi, M. A .)2012). Le grenadier tunisien (Punicagranatum) 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. Mémoire., Fac. Med. Tunis, 82p

[67] Spichiger ,R.E et Savolainen ,V.(2005). Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales (Troisième édition). Presses polytechniques et universitaires romandes (EDS), 413 p.

[68]Mars M, Carraut, A., Marrakchi, M., Gouiaa, M. et Gaaliche, F. Ressources génétiques fruitières en Tunisie (poirier, oranger, figuier, grenadier). Plant genetic Resources Newslette. 1994;100:1-4.

[69]. Mars MeS, S. Etude comparative de la qualité des fruits de cinq variétés de grenadier (Punica granatum L.). Revue des Régions Arides. 1992;92:45-57.

[70]Jbir R, Hasnaoui N, Mars M, Marrakchi M, Trifi M. Characterization of Tunisian pomegranate (Punica granatum L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. Scientia Horticulturae. 2008;115(3):231-7.

[71]Meerts I.A.T.M., Verspeek-Rip C.M., Buskens C.A.F., Keizer H.G., Bassaganya-RieraJ., Jouni Z.E., Van Huygevoort A.H.B.M., Van Otterdijk F.M. et Van de Waart E.J.(2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. Chemical Toxicology 47 : 1085–1092.

[71] Kim N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P.,Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B. et Lansky E. (**2002).** Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (Punica granatum) for human breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, 71**:** 203–217.

[72]Lansky E. et Newman R. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of Ethnopharmacology.109: 177–206.

[73]Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S. et Chowwanapoonpohn S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. Food Chemistry, 103 : 839–846

[73]Çam M., Hısıl Y. et Durmaz G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based onantioxidant capacity measured by four methods. Food Chemistry, 112 : 721–726

[74]Gil M. I., Toms-Barbern F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M. et Kader A. A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. J. Agric. Food Chem., 48 : 4581-4589.

[75] Lansky E. et Newman R. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of Ethnopharmacology.109: 177–206.

[76] Fabre B. et Ermosilla V. (2008). Utilisation d'un extrait de grenadier pour le maintien de lacoloration capillaire. Fascicule de brevet européen. Bulletin 2008/01

.[77] **Seeram N. P., Risa N. S. et Heber D. (2006).** Pomegranates Ancient Roots to Modern. Medicine CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 263p, ISBN : 0-8493-9812-6.

[78] Jahfar M., Vijayan K.K. et Azadi P. (2003). Studies on a polysaccharide from the fruit rindof Punica granatum. Research Journal of Chemistry and Environment, 7 : 43–50.

[79] Vidal A., Fallarero A., Peña B. R., Medina M. E., Gra B., Rivera F., Gutierrez Y. et Vuorela P. M. (2003). Studies on the toxicity of Punica granatum L. (Punicaceae) whole fruit extracts. Journal of Ethnopharmacology 89 : 295–300.

[80]GARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L., et al. - Ressources médicinales de la flore française. Editions Vigot Frères. 1961. Tome II. 1511 pages. Pages 838-842.

[81]GODET J.D. - Arbres et arbustes aux quatre saisons. Les guides pratiques du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé. 1991. 215 pages. Pages 96 et 170.

[82]Ghadirian, P., Ekoe, J.M., Thouez, J.P., 1992. Food habitsand esophageal cancer: an overview. Cancer Detect. Prev. 16, 163–168.

[83]Courchet L.D.J. - Traité de botanique : comprenant l'anatomie et la physiologie végétales et les familles naturelles, à l'usage des candidats au certificat d'études physiques, chimiques et naturelles des étudiants en médecine et en pharmacie. Editions Baillière. 1897. 1320 pages. Pages 1019-1023.

[84]Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B.R., Medina, M.E., Gra, B., Rivera, F., Gutier rez, Y., Vuorela, P.M., 2003. Studies on the toxicity of Punica granatum L. (Punicaceae) whole fruit extracts.J. Ethnopharm. 89, 295–300.

[85] Bartels A. - Guide des plantes du bassin méditerranéen. Editions Ulmer. 1998. 400 pages. Page 352

[86]Akpinar-Bayizi A., Ozcan T., Yilmaz-Ersan L., 2012. The therapeutic potential of pomegranate and its products for prevention of cancer: Cancer Prevention-From Mechanisms to Transitional Benefits, p.331- 372.

[87]Holland D., Hatib K., Bar-Ya'akov I., 2009. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. Horticultural Reviews, vol 35, p.127- 191

[88]Sreekumar S., Sithul H., Muraleedharan P., Azeez J.M, Sreeharshan S., 2014. Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. BioMed Research International, vol 2014, p. 1-12. doi:10.1155/2014/686921

[89]Jurenka J., 2008. Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): a review. Alternative medicine review, vol 13, no 2, pp. 128. **Neurath A.R., Strick N., LI Y. [90]Y., Debnath A.K., 2004.** Punica granatum (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. BMC Infectious Diseases, vol 1056, no 1, p. 311-327.

[91]Ahmed S.A., Abood, N.H. and Al-Janabi, A.A., 2013. Antimicrobial effect of Pomegranate peels extract on some pathogenic microorganisms. Engineering & Technology Journal, vol 31, no 3, pp. 1-5.

[92]Lansky E.P., Newman R.A., 2007. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of ethnopharmacology, vol 109, no 2, p. 177-206

[92]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 insulino-indépendante de l'AMPK. Diplôme – Maitrise en Pharmacologie, Université de Montréal.

[92]Bhowmik D., Gopinath H., Kumar B.P., Kumar K., 2013. Medicinal uses of Punica granatum and its health benefits. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, vol 1, no 5, p. 28-35.

[93]Nagaraju N., Rao K.N., 1990. A survey of plant crude drugs of Rayalaseema, Andhra Pradesh, India.Journal of Ethnopharmacology, vol 29, p.137–158.

[94]Boukef K., Souissi H.R., Balansard G., 1982. Contribution to the study of plants used in traditional medicine in Tunisia. Plant Medicine and Phytotherapy, vol 16, p. 260–279.

[95]Caceres A., Giron L.M., Alvarado S.R., Torres M.F., 1987. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. Journal of Ethnopharmacology, vol 20, p. 223–237

[96]Gujral M.L., Varma D.R., Sareen K.N., 1960. Oral contraceptives.Part 1.Preliminary observations on the antifertility effect of some indigenous drugs. Indian Journal of Medical Research, vol 48, p. 46–51.

[97]Saxena A., Vikram N.K., 2004. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. Journal of Alternative and Complementary Medicine, vol 10, p. 369–378.

[98]Shaygannia E., Bahmani M., Zamanzad B., Rafieian-Kopaei M., 2016.A review study on Punica granatum L. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine, vol 21, no 3, p. 221-227.

[99]Su X., Sangster M. Y., D'Souza D. H., 2010. In vitro effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on foodborne viral surrogates. Foodborne Pathogens and Disease, vol 7, no 12, p.1473-1479

[100]Al-Zoreky N.S., 2009. Antimicrobial Activity of Pomegranate (Punica granatum L.) Fruit Peels. International Journal of Food Microbiology, vol 134, no 3, p.244 - 48.

[101]Albrecht M., Jiang W., Kumi-Diaka J., Lansky E.P., Gommersall, L.M., Patel A., Neeman E.M.I., Geldof A.A., Campbell, M. J., 2004. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. Journal of Medicinal Food, vol 7, no 3, p. 274-283.

[102]Hora J.J., Maydew E.R., Lansky E.P., Dwivedi C., 2003. Chemopreventive Effects of Pomegranate Seed Oil on Skin Tumor Development in CD1 Mice.Journal of Medicinal Food, vol 6, no 3, p. 157-161.

[103]CLAY H.F., HUBBARD **J.C., GOLT R., 1987**. Tropical Shrubs. University of Hawaii Press, Honolulu, 284p.

[104]BRUNETO J., 1999. Phermacognosie phytochimie plante médicinales. édition N 3:Tec et Doc, Paris, 1120p.

[105] Basu ,A. Penugonda , K.)2009). Pomegranate juice: aheart-healthy fruit juice. Nutr

Rev.67(1):49-56.

[106] Seeram ,N.P. Lee, R. Heber, D. (2004(. Bioavailability of ellagicacid in human plasma

after consumption of ellagitannins from pomegranate (Punicagranatum L.) juice. Clin Chim

Acta;348(1-2):63-8.

[107] Schubert, S.Y. Lansky, E.P. Neeman ,I.) 1999(. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J Ethnopharmacol;66(1):11-7.

[108] Albrecht, M. Jiang. W Kumi-Diaka ,J. Lansky, E.P.Gommersall ,L.M .et Patel ,A.)2004).

Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograftgrowth, and invasion of human prostate cancer cells. J Med Food. Fall;7(3):274-83.

[109] Malik .A. Afaq ,F. Sarfaraz ,S. Adhami, V.M. Syed ,D.N .Mukhtar ,H.)2005).

Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 11;102(41):14813-8.

[110] Pantuck ,A.J. Leppert. J.T.Zomorodian, N. Aronson , W.Hong ,J. et Barnard .RJ. (2006).

Phase II study of pomegranate juice for men withrising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. Clin Cancer Res;12(13):4018-26.

[111] Esmaillzadeh ,A. Tahbaz, F. Gaieni, I. Alavi-Majd ,H.Azadbakht ,L. (2006).

Cholesterol lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. Int J Vitam NutrRes;76(3):147-51.

[112] Rosenblat , M. Hayek T, Aviram M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice

(PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages.Atherosclerosis. Aug;187(2):363-71.

[113] Prashanth ,D et Asha, M.K.(2001). Antibacterial activity of Punicagranatum.Fitoterapia.2001. N°72. Pages 171-173.

[114]Championnièrre J. L.(1850). Journal de médecine et de chirurgie pratique: à l'usage desmediciens praticiens. Imprimerie de Crapelet (EDS), Paris, 21p.

[115] Ajaikumar ,KB Et al.(2005). The inhibition of astricmucosalinjury by Punicagranatum L.(pomegranate) methanolic extract. J Ethnopharmacol. 4;96(1-2):171-6.

[116] Murphy, K.N.(2004). Study on wound healing activity of Punicagranatum peel. J Med Food. 2004 Summer;7(2):256-9.

[117]Drayton D.L., Liao S., Mounzer R. H., Ruddle N. H., 2006. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. Nature immunology, vol 7, no 4, p. 344–353.Doi : 10.1038/ni1330

[118] Urquiaga,I. N. E. S. and Leighton, F. E. D. E. (2000) .Plant PolyphenolAntioxidants and Oxidative Stress. Biol. Res. 33: 55-64.

[119] Bessas .A, Benmoussa. L, Kerarma. M ,(2008)," Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien ."Mémoire de fin d'étude .

[120] Laraoui,H . (2007). docteur de l'université Louis pasteur "Etude Phyotchimique l'Extrait Chloroformique de Bupleurum Atlanticum. Universite El Hadj Lakhdar Batna. **[121]Karl perron. 2018.** Section de biologie université de genève.

[122] D'Archivio ,M. Filesi ,C. Di Benedetto ,R. Gargiulo , R. Giovannini ,C. et Masella, R.

(2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability.Annali-dellIstituto-Superiore-di-Sanità. 43(4) : 348-361.

[123] Long ,H.S. Tilney, P.M. et Van Wyk B.-E. (2010). The ethnobotany and pharmacognosy of Oleaeuropaeasubsp. africana (Oleaceae). South African Journal of Botany. 76 (02): 167-420

[124] Davies J & Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev **74**: 417-433.

[125] **Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA & Collins JJ (2007)** A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell **130**: 797-810

[126] 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

[127]Cowan, 1999 Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annu Rev Microbiol **64**: 163-184.

[128] Scalbert, 1991 La résistance aux agents antimicrobiens des bactéries engagées dans la motilité de type swarming. Mémoire de maîtrise, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada.

[129]Daglia, 2011 How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nat Rev Microbiol **8**: 423-435

[130] Sandharet al.,2011 Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Adv Drug Deliv Rev **57**: 1486-1513.

[131] Mason et Wasserman, 1987 La résistance aux agents antimicrobiens des bactéries engagées dans la motilité de type swarming. Mémoire de maîtrise, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada.

[132]Dworkin,M., Falkow,S., Rosenberg,E., Schkeufer, KH., Stackebrandt,E. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd.;Springer, New-York, 2006.Vol 4, Chap.1.2.1. The genera Staphylococcus and Macrococcus, p4-75 **.**

[133]Hakalehto, E., Vilpponen-Salmela, T., Kinnunen, K., & von Wright, A. (2011). Lactic Acid bacteria enriched from human gastric biopsies. ISRN Gastroenterology, 2011, 109183.Han, X. Y., Kamana, M., & Rolston, K. V. I. (2006). Viridans streptococci isolated by culture from blood of cancer patients: clinical and microbiologic analysis of 50 cases. Journal of Clinical Microbiology, 44(1), 160–5 **.**

[134]Kloos, WE., Zimmerman, RJ., Smith, RF. Preliminary studies on the characterization anddistribution of Staphylococcus and Micrococcus species on animal skin. Appl Environ Microbiol. 2005; 31, p53-49

[135]Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol infect. 2003; 130, p33-40.

[136]Callon, C., Gilbert, FB., De Cremoux, R., Montel, MC. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of S.aureus contamination from milk to cheese in goat cheese farms. Food Control. 2007; 19, p143-150 **.**

[137]Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. Appl Environ microbiol. 2005; 71, p2793- 2795.

[138]Haouzi R. (2013). Etude biologique des effets des microondes sur Escherichia coli. Mémoire. Université des sciences et de la technologie d'Oron Mohamed Boudiaf. 60P.

[139]Guinebretière et al., (2008). Ecological diversification in the Bacilluscereus Group. Environ. Microbiol. 10, 851-865.

[140]InVS (2010). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. BEH no 31-32.

[141] El brahmi redouane M. (2013). Profile épidémiologique et de résistance des bactéries multirésistantes aux CHU hassanII de Fès .thèse de doctorat. Université sidi Mohammed benAbdallah faculté de médecine et de pharmacie Fès. 111 P.

[141] Muylaert A., Mainil J.G. (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur Contagiosité.

[142] Lozniewskai A., Rabaud N. (2010).résistance bactérienne aux antibiotiques.[en ligne]. (http://nosobase.chulyon.fr/recommandations/cclin_arlin/cclinSudEst/2010_ResistanceAntibiotiques_CClinSE.pdf. (Consulté le 21/03/2017).

[143] Mahfoud M. (2015). Résistance bactérienne aux antibiotiques. [En ligne]. http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/bacterio09-resistance_sensibilite_atb. (Consulté le 21/03/2017).**(8).**

[144]Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chem. 89 ,27-36 **.**

[145]SOULEY LIE MOUSTAPHA F S. 2002. Sensibilité et évolution de la résistance de Pseudomonas aeruginosa aux antibiotiques à l'hôpital du point G .Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P95 **.**

[146]YETERIAN E.2010.Base moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chezPseudomonas aeruginosa.Université Strasboug Thèse de doctorat p.11 **.**

[147]Dworkin,M., Falkow,S., Rosenberg,E., Schkeufer, KH., Stackebrandt,E. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd.;Springer, New-York, 2006.Vol 4, Chap.1.2.1. The genera Staphylococcus and Macrococcus, p4-75 **.**

[148]Hakalehto, E., Vilpponen-Salmela, T., Kinnunen, K., & von Wright, A. (2011). Lactic Acid bacteria enriched from human gastric biopsies. ISRN Gastroenterology, 2011, 109183.Han, X. Y., Kamana, M., & Rolston, K. V. I. (2006). Viridans streptococci isolated by culture from blood of cancer patients: clinical and microbiologic analysis of 50 cases. Journal of Clinical Microbiology, 44(1), 160–5 **.**

[149]Kloos, WE., Zimmerman, RJ., Smith, RF. Preliminary studies on the characterization anddistribution of Staphylococcus and Micrococcus species on animal skin. Appl Environ Microbiol. 2005; 31, p53-49

[150]Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol infect. 2003; 130, p33-40.

[151]Callon, C., Gilbert, FB., De Cremoux, R., Montel, MC. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of S.aureus contamination from milk to cheese in goat cheese farms. Food Control. 2007; 19, p143-150 **.**

[152]Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. Appl Environ microbiol. 2005; 71, p2793- 2795.

[153]Haouzi R. (2013). Etude biologique des effets des microondes sur Escherichia coli.

[154]Singh M., Jha A., Kumar A., Hettiarachchy N., Rai, A. K.,Sharma D., 2014. Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. Journal of food science and technology, vol 51, no 9, p.2070-2077.

[155]Wang Z., Pan Z., Ma H., Atungulu G.G., 2011. Extract of phenolics from pomegranate peels. The Open Food Science Journal, vol 5, p. 17-25. Doi :http://dx.doi.org/10.2174/1874256401105010017

[156]Bingham S. A., Day N.E., Luben, R., 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European prospective investigation into cancer nutrition (EPIC): an observational study. Lancet, vol 361, p.1496-150

[156]Fischer U. A., Carle R., Kammerer D.R., 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. Food Chemistry, vol 127, p. 807-8211

[157]Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J., Cheng S., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chemistry, vol 96, p. 254−260

[158]Ben Nasr C., Ayed N. et Metche M. (1996). Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. Z Lebensm Unters Forsch, 203:374-378.

[159]Mirdehghan S. H. et Rahemi M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (Punica granatum L.) fruit. Scientia Horticulturae 111 : 120–127

[160]Kylli, P., 2010. Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties

[161]Sepulveda E., Saenz C., Pena A., Robert P., Bartolome, B., Gomez-Cordoves C., 2010. Influence of the genotype on the anthocyanin composition, antioxidant capacity and color of Chilean pomegranate (Punica granatum L.) juices. Chilean Journal of Agricultural Research, vol 70, no 1, p. 50-57.

[161]El Kar C., Ferchichi A., Attia F., Bouajila J., 2011. Pomegranate (Punica granatum) Juices: chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity. Journal Food of Science, vol 76, p.95–800.

[162]Ozkal, N, Dinc S., 1994. Evaluation of the pomegranate (Punica granatum L.) peels from the standpoint of pharmacy. Ankara University Eczacilik Fak Derg, vol 22, p.21-29.

[163]Souleman A.M., Ibrahim G.E., 2016. Evaluation of Egyptian pomegranate cultivars for antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents. Egyptian Pharmaceutical Journal, vol 15, no 3, p. 143-149.

[164]Shiban, M. S., Al-Otaibi, M. M., Al-Zoreky, N. S., 2012. Antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels. Food and Nutrition Sciences, vol 3, no 07, pp. 991. Negi P., Jayaprakasha J., 2003. “Antioxidant and Antibacterial Activities of Punica granatum Peel Extracts,” Journal of Food Science, Vol. 68, No. 4, 2003, pp. 1473-1477

[165]Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A., 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanin, betalains and carotenoids. Plant Journal, vol 54, p. 733–749.doi: 10.1111/j.1365-

313X.2008.03447.x

[166]Shulman Y., Fainberstein L., Lavee S., 1984. Pomegranate fruit development and maturation.Journal of Horticultural Science, vol 59, no 9, p.265–274.

[167]Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J., Cheng S., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chemistry, vol 96, p. 254−260Lu J., Holmgren A., 2014.The thioredoxin antioxidant system.Free Radical Biology and Medicine, vol 66, p. 75-87.

[168]Singh M., Jha A., Kumar A., Hettiarachchy N., Rai, A. K.,Sharma D., 2014. Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. Journal of food science and technology, vol 51, no 9, p.2070-2077.

[169]Kasliwal, A and F. Quadri, 2016.Evaluation of Antioxidant Activity of Punica granatum. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, vol 5, no 7, p. 12179-12188.

[170]Kulkarni A.P. and Aradhya S.M. 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. Food Chemistry, vol 93, p.319–324

[171]Huang S.Q., Ding S.D., Fan L.P., 2012. Antioxidant activities of five polysaccharides from Inonotus obliquus. International Journal of Biological Macromolecules, vol 50, p.1183–1187

[172]Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal.Biochem. 239(1), 70-76

[173]Rhen T., Cidlowski J.A., 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs.New England Journal of Medicine, vol 353, no 16, p.1711–1723.

[174]Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N., 2008. Antioxidant activity of Smilax excelsa L. leaf extracts. Food Chemistry, vol 110, no 3, p. 571-583.

[175] Berra, D. (2015).Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des

feuilles de Matricaria Pubescens. Thèse de masters, Universite Echahide Hamma

Lakhdar EL Oued, p33. P42.

[176]Shiban, M. S., Al-Otaibi, M. M., Al-Zoreky, N. S., 2012. Antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels. Food and Nutrition Sciences, vol 3, no 07, pp. 991.

[177] Meyer, A.S., Koser, C., Adler-Nissen, J., 2001.Efficiency of enzymatic and other alternative clarification and fining treatments on turbidity and haze in cherry juice.J. Agric. Food Chem. 49, 3644–3650.

[178] Hagerman A.E., 2002. Hydrolyzable tannin structural chemistry.Tannin Handbook. Miami University: Miami, FL, USA.

[179]Kawakami T., 2008. Basophils now enhance memory. Nature immunology, vol 9, vol 7, p. 720-721.

[180]COWAN, MM., 1999. Plant product as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, vol. 12, no. 4, p. 564-582.

[181]Fawole O.A., Opara U.L., 2013. Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review. Scientia Horticulturae, vol 159, p. 152-161.

Annexes

Composition de bouillon nutritif BN :
Peptone…….10g.

Extrait de levure……....3g.

Extrait de vionde ……..5g.

NaCl……..5g.

Composition de Gélose MUELLER-HINTON (MH) :

Infusion de viande de bœuf…300ml.

Peptone de caséine……..17.5g.

Amidon de mais……1,5g.

Agar……17g.

Ph final=7.4

L'extraction :



Figure 44 : Le filtrat obtenu avant la concentration par le rotavaport

- **Le dosage des polyphénol :**

Préparation de 20ml de 7.5% de $NaCO^3$:

7.5g$NaCO^3$ ⟶ 100ml(eau.d).

X'g ⟶ 20ml.

X'=20*7.5/100 ⟶ X=1.5g.

- **Le dosage du flavonoide :**

- **Préparation de 20ml de Nitrate de sodium ($NaNo^3$) :**

0.5g $NaNO^3$ ⟶ 100ml (eau .d).

X''g ⟶ 20ml.

X''=20*0.5/100 ⟶ X''=0.1g.

Préparation de 20ml de 10%$AlCl^3$:

0.5$AlCl^3$ ⟶ 100ml(eau.d).

Yg ⟶ 20ml.

Y=20*10/100 ⟶ Y=2g.

Préparation de 20ml d'une mole d'Hydroxyde de sodium (NaOH) :

On a :M NaOH =40g/mol ⟶

40g NaOH ⟶ 1mol(100 ml)

Y'g ⟶ 20ml.

Y''=20*10/100 ⟶ Y=2g.

- **Test de l'éffet antioxydant :**
  - ✓ **Test DPPH :**

Préparation de 1Mm de DPPH :

0.04 ⟶ 100ml.

X ⟶ 10 ml.

X= 10*0.04/100 X=0.004 g.

Le pourcentage d'inhibition (% I) du radical DPPH par les extraits acétonique d'écorce de *Punica granatum* et de vitamine C est calculé comme suit :

%DPPH=(AbsT-AbsE/AbsT).100

Où :

□□**% DPPH :** Taux du DPPH piégé ou taux d'inhibitions.

□□**Abs T :** Absorbance du témoin (solution de DPPH –blanc) en (nm) .avec[AbsT=1.663]

□□**Abs E :** Absorbance de l'échantillon.

- ✓ **Test de réduction du Fer: FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :**

Préparation de 50ml de $K^3[Fe(CN)6]$ a1% :

1g $K^3[Fe(CN)6]$ ⟶ 100ml(eau.d)

Y''g ⟶ 50ml

Y''=50*1/100 ⟶ X''0.5g.

Préparation de 20 ml de Nitrate de sodium ($NaNO^3$) :

10 g TCA ⟶ 100 ml(eau.d).

Z g ⟶ 10 ml

Z= 10*10/100 ⟶ Z=1g

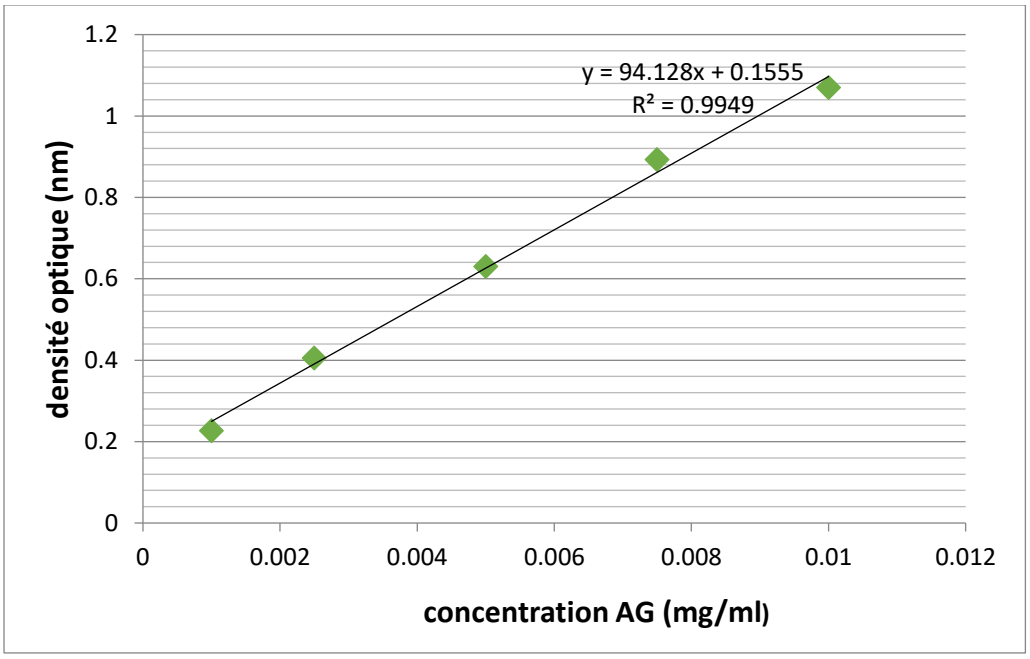


Figure : *Courbe d'étalonnage de l'acide gallique*

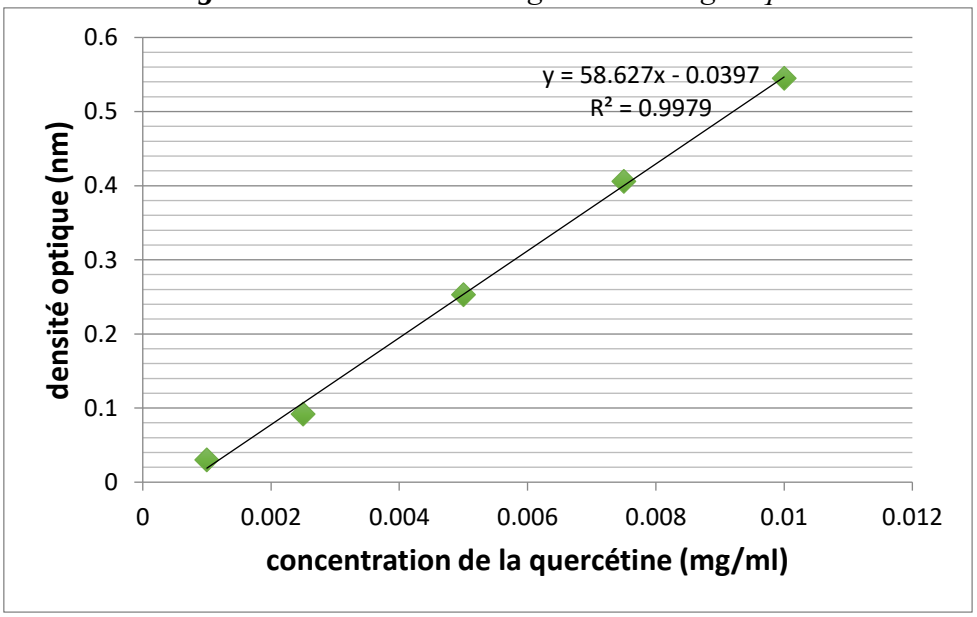


Figure: *Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux*