الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES
Département des sciences de la nature et de la vie

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de Master

En Sciences Biologique

Spécialité : Microbiologie appliqué

Thème

L'activité antimicrobienne et antioxydante d'une plante d'intérêt médicinale du grenadier

Présenté par :

- **M^elle^ CHERIFI Meriem Batoul**
- **M^elle^ BRAHIMI Louiza**
- **M^elle^ MERBOUCHE Khaoula**

Devant le jury composé de :

Mme BELKACEM Imene	MCB	U. Médéa	Présidente
Mme CHAOUATTI Karima	MAA	U. Médéa	Examinatrice
Mme SIOUDA Wafa	MCB	U. Médéa	Promotrice
Mme SEHARI Nadia Hanane	MCB	U. Médéa	Co-Promotrice

Année universitaire 2021/2022



Dédicaces

Je le dédie aux personnes qui me sont plus chères au monde ;

À mon Père Khaled et ma mère, qui m'ont soutenu nuits et jours durant tout mon parcours, avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé et à mes coté.

A mon très cher frère et unique AbderraRahim.

A ma grande sœur Asma et son époux et ses petits Lina et Jawad

A m es très chère sœurs : Hadjer, Hiba.

A toutes la famille Cherifi et Belhouadjeb

A mes très chère amies : Fatima Maroua Fadoua Leila Meriem Maroua DjaouidaNachoua et Chaïma

A mes trinôme Khaoula et Louiza et toutes ses familles

A toute la promotion microbiologie appliqué 2021_2022

A moi-même.



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

A mes chers frères Marouane et son épouse et mon petit frère Aboubakret toute la famille Atroussi ainsi que mes tantes Rabi yarhamhom et mes cousines Kaouthar Aicha et Houda.

A tous mes amies : Feriel, Saliha, MeriemFahima, Khaoula.

A mes trinômes : Meriem Batoul, Louiza.

A toute la promo microbiologie appliqué 2021_2022.

Khaoula



Avec l'aide d'Allah, le tout puissant, ce travail est achevé ;

Je le dédie à toutes personnes qui me sont chères ;

Ma très chère mère qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissante, merci maman.Mon très cher père qui m'a donné un magnifique modèle de volonté,merci papa, Avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé.

A ma grand- mèreet grandpère.et toute la famille brahimi.

A mes très chers frères :Abdelmalek et Abdelbaki

A ma très chères soeurs:Manar et Hadil .

A mes cousins(es), oncles, tantes.

A mes amies : Amina, Ismahane,Fatima,khaoula ,Nacira, lina et Firouz

A mes trinômes : Meriem Batoul et Khaoula.

Remercîments

Louange à Allah, Seigneur de l'univers, le tout puissant le miséricordieux qui nous a inspiré et combler de bienfaits, on lui rend grâce.

Nous remercions énormément notre promotrice Mme Siouda Wafa pour son encadrement et ses conseils et surtout pour sa gentillesse.

Nous tenons à remercier vivement Mme Belkacem Imene d'avoir présidé le jury.

Et Mme Chaouatti Karima d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce travail.

Résumé

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *punica*, ce dernier 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 ayant des activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Punica granatum***.** Les extraits organiques de ce dernier ont été obtenus par macération en utilisant trois solvants : éthanol, méthanol et aqueux. Les rendements respectifs sont de : 22,35%, 35,06%, 30,01%. L'activité antioxydante évaluée en utilisant la technique de réduction du radical libre DPPH est la plus élevée dans l'extrait éthanolique, suivie par l'extrait méthanolique, tandis qu'elle est faible pour l'extrait aqueux. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur 4 souches microbiennes (2 souches Gram **-** : *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* 2 souches Gram **+** : *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*), selon la méthode de diffusion de disque. Les résultats indiquent que les trois extraits possèdent une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées. Par conséquent, l'écorce de grenade peut être valorisée et utilisée afin de formuler de nouveaux conservateurs et antioxydants naturels à utiliser dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Mots clés :

Punica granatum, Activité antioxydante, extraits organiques, Activité antimicrobienne.

Abstract

Among the medicinal plants that constitutes the vegetation cover is the genus *Punica*, which is widely distributed mainly in semi-arid regions. Many species of this type are used in traditional medicine because they contain several molecules with therapeutic activities; among the known species is *Punica granatum.* The organic extracts of the latter were obtained by maceration using three solvents: ethanol, methanol and water. The respective yields are: 22, 35%, 35, 06%,30, 01%. The antioxidant activity evaluated by using the free radical reduction of DPPH, which is represented the highest in the ethanol extract, but it is low for the other two extracts. Antimicrobial activity was determined on 4 microbial strains (2 strains Gram- : *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, 2 strains Gram+ : *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*), according to the disk diffusion method. The results indicate that the three extracts possess antimicrobial activity on all the strains tested. Therefore, this study has indicated that pomegranate peel extract can be used to formulate new products for use in food and pharmaceutical industries as natural antioxydant through substituting them for synthetic antioxidants and also as natural preservatives.

Key words: *Punica granatum*, Antioxidant activity, organic extracts, Antimicrobial activity.

.

الملخص

من بين النباتات الطبية التي يتألف منها الغطاء النباتي، جنس *Punica*، الذي ينتشر على نطاق واسع بشكل رئيسي في المناطق شبه القاحلة. تُستخدم العديد من الأنواع من هذا النوع في الطب التقليدي لاحتوائها على عدة جزيئات ذات أنشطة علاجية، ومن أشهر الأنواع المستخلصة العضوية من هذا النوع تم الحصول عليها عن طريق النقع باستخدام ثلاثة مذيبات: الإيثانول والميثانول والمائي. عائدات كل منهما هي: 22.35٪، 35.06٪، 30.01٪ .تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام تقنية تقليل الجذور الحرة DPPH وهو الأعلى في مستخلص الإيثانول، ولكنه منخفض بالنسبة للمستخلصين الآخرين. تم تحديد نشاط مضادات الميكروبات على 4 سلالات ميكروبية (سلالتان جرام- : *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، 2 سلالات جرام +: *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*). تشير النتائج إلى أن المستخلصات الثلاثة تمتلك نشاطًا مضادًا للميكروبات على جميع السلالات المختبرة. لذلك أوضحت هذه الدراسة أن مستخلص لحاء الرمان يمكن استخدامه في صياغة منتجات جديدة لاستخدامها في الصناعات الغذائية والصيدلانية كمضادات أكسدة طبيعية من خلال استبدالها بمضادات الأكسدة الاصطناعية وأيضًا كمواد حافظة طبيعية.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum*، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، المستخلصات العضوية..

Sommaire

Introduction ……. 01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Présentation de la plante……... 03
I.1.1 Historique…… 03
I.1.2 Monographie de grenadier……. 04
I.1.2.1 Etymologie et dénomination…….. 04
I.1.3 Répartition géographique du grenadier…….. 05
I.1.4 Description générale de grenadier……. 05
I.1.4.1 Les feuilles……. 05
I.1.4.2 Les fleurs……..... 06
I.1.4.3 Les fruits…….... 07
I.1.4.4 L'écorce……. 07
I.1.5 La culture du grenadier…….. 08
I.1.6 Principaux constituants chimiques et la valeur nutritionnelle du grenadier ….. 08
I.1.6.1 Le jus…….. 09
I.1.6.2 Les pépins……. 10
I.1.6.2 La peau……... 10
I.1.7 Utilisation traditionnelle……..... 11
I.1.8 Utilisation pharmacologique…… 12
I.1.8.1 L'activité anti-inflammatoire……. 12
I.1.8.2 l'activité antioxydante……..... 13
I.1.8.3 Prévention des maladies cardiovasculaires……..... 14
I.1.8.4 L'activité antidiabétique……..... 15
I.1.8.5 Activité anti-cancéreuses et anti- tumorale……..... 16
I.1.8.6 L'activité antimicrobienne……. 16
I.2 Activité antioxydante……. 17
I.2.1 Radical libre……. 18
I.2.2 Rôles biologiques des radicaux libres …… 18
I.2.3 Stress oxydant …… 19
I.2.4 Stress oxydant et pathologies humaines …… 20
I.2.5 Antioxydant……... 21
I.3 Activité antimicrobienne …… 22

I.3.1	Généralité……..	22
I.3.2	Rappel sur les bactéries ……	22
I.3.3	Caractéristiques des souches bactériennes utilisées…….	23
I.3.3.1	*Staphylococcus aureus*. …….	23
I.3.3.2	*Pseudomonas aeroginosa*. …….	24
I.3.3.3	*Escherichia coli*.…….	25
I.3.4	Les Antibiotiques. …….	25
I.3.5	Principe de base d'une antibiothérapie. ……	26
I.3.6	Résistance des antibiotiques. ……	26
I.3.7	Mécanisme d'action des antibiotiques. ……..	27
I.4	Métabolite secondaire. ……...	29
I.4.1	Composés phénoliques……...	30
I.4.2	Acides phénols et les coumarines……..	31
I.4.2.1	Acides phénoliques ……	31
I.4.2.2	Les acides benzoïques ……	31
I.4.2.3	Les acides cinnamiques…….	32
I.4.2.4	Flavonoïdes ……	32
I.4.2.4	Flavonols ……	33
I.4.2.6	Anthocyanes……..	34
I.4.2.7	Tanins ……	34
I.4.3	Pouvoir antioxydant des composés phénoliques……...	34
	Chapitre II : Matériels et Méthodes	
II.1	Matériel…….	36
II.1.1	Matériel végétal…….	36
II.1.2	Séchage, broyage et tamisage ……	36
II.1.3	Matériel de laboratoire……...	37
II.1.4	Le matériel biologique……...	37
II.1.5	Les antibiotiques utilisés ……	38
II.1.6	L'appareillage ……	38
II.2	Méthodes ……	38
II.2.1	Préparation de l'extrait de l'écorce de *Punica granatum*……...	38
II.2.2	Protocol extrait aqueux et alcoolique (méthanol et éthanol)…….	40
II.2.3	Détermination du rendement d'extraction. ……	42
II.3	Tests des activités biologiques……..	42
II.3.1	Test de l'activité antioxydante……..	42
II.3.1.1	Evaluation du potentiel anti-radicalaire par le calcul de l'IC50 ……	44

II.3.2 Test de l'activité antimicrobienne …… 44
II.3.2.1 Préparation des dilutions des extraits …… 45
II.3.2.2 Préparation de l'inoculum…… 45
II.3.2.3 Préparation des disques…… 45
II.3.2.4 Ensemencement et dépôt des disques …… 45
II.3.2.5 Choix des antibiotiques utilisés…… 46
II.3.2.6 Détermination des CMI et CMB …… 46
II.3.2.7 Lecture des résultats…….. 47

Chapitre III : Résultats et Discussion.

III.1 Rendement de l'extraction……. 48
III.2 Etude de l'activité antioxydante des extraits étudiés……. 49
III.2.1 Piégeage du radical DPPH…… 49
III.3 Etude de l'activité antimicrobienne des extraits étudiés …… 51
Conclusion et perspective. 57
Références bibliographiques. 59
Annexes

Liste de tableau

	Titre	Page
I	Classification botanique de *Punica granatum*	04
II	Composition biochimique et valeur nutritionnelle de la grenade.	11
III	Les différents radicaux libres.	19
IV	Les différents mécanismes de l'activité antioxydante.	22
V	Produits chimiques et milieux de culture utilisés.	37
VI	les souches bactériennes utilisées.	37
VII	Aspect, couleur et % du rendement des différents extraits d'écorces de la Grenade	48
VIII	Souche A : *Pseudomonas aeroginosa*	51
IX	Souche B *: Bacillus cereus*	52
X	Souche C *: Escherichia coli*	52
XI	Souche D *: staphylococcus aureus*	53

Liste des figures

	Titre	Page
01	Centres d'origines et de diversité des plantes cultivées	03
02	Fleurs et fruits du Grenadier (*Punicagranatum)*	05
03	Les feuilles de *Punicagranatum.*	06
04	Fleur de *Punicagranatum*	06
05	Fruit de *Punicagranatum*	07
06	L'écorce de *punicagranatum*	07
07	Feuilles Fleurs Fruits et écorce de *Punicagranatum*	08
08	La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	20
09	Aspect morphologique des microorganismes étudiés	25
10	Mode d'action des antibiotiques.	27
11	Acide gallique.	31
12	Acide éllagique.	31
13	Umbelliférone.	32
14	Scopolétine.	32
15	Squelette de base des flavonoïdes.	33
16	squelette de flavonols.	33
17	Poudre d'écorce de *Punica granatum.*	36
18	L'antibiotique « AMOXYPEN ».	38
19	Les étapes de préparation de l'extrait aqueux.	39
20	Les étapes de préparation de l'extrait alcoolique.	40
21	Protocole de préparation de la matière végétale et des extraits bruts de l'écorce de fruit grenade Punicagranatum.	41
22	Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl).	43
23	Préparation de suspension bactérienne.	45
24	Préparation de l'activité antimicrobienne.	47
25	Secteur du rendement.	48
26	Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH• par les extraits.	49
27	préparation de test antimicrobien sur l'EG.	51
28	Résultats des tests antibactériens de l'EG vis-à-vis des bactéries.	54
29	Résultat de test antimicrobien (*Pseudomonas aeroginosa*) sur l'EG.	55

Liste des abréviations

CBM : concentrations bactéricide minimale

CI50 : Concentration inhibitrice 50%.

CMI : concentrations minimales d'inhibitions.

DMSO : diméthyle sulfoxyde

DPPH : 1.1- diphényl-2-picryl-hydrazyl.

E. coli : Escherichia coli.

EG : Extrait de l'écorce de grenade.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

g : gramme.

h : heure

MH : Mueller-Hinton.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

R : Rendement.

ROS : Radicaux libres oxygénés.

Vit : vitamine.

Vit C : Vitamine C.

Introduction

Ces dernières années, la recherche sur les plantes médicinales a attiré une attention globale surtout sur les plantes utilisées dans la médicine traditionnelle comme un complément ou un traitement des maladies humaines, parce que ces plantes sont riches en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les tanins, les flavonoïdes…, qui ont plusieurs propriétés : antioxydante, antimicrobienne …etc. **(Cowan, 1999; Dahanukar *et al*., 2000).**

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 possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Punica*, ce dernier 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 d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Punicagranatum* (l'arbre du grenadier).

L'importance économique du grenadier réside dans ses fruits qui ont une grande valeur nutritive. Cette dernière lui a attribué plusieurs propriétés aussi bien dans le domainemédical que dans le domaine agro-alimentaire. En effet des études ont confirmé que la grenade possède des propriétés antidiabétiques et anti-cancérigènes et il est largement utilisé pour traiter les troubles digestives. D'autres études ont montré que la grenade possède des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes et lutte contre la détérioration des produits alimentaires.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail, dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'écorce du fruit de *Punica granatum*.

Dans ce présent travail, l'étude sera divisée en trois chapitres :

- Le premier est une synthèse bibliographique de quelques rappels sur les radicaux libres, stress oxydatif, les antioxydants et la plante étudiée.

- Le deuxième est consacré à l'étude expérimentale, qui porte sur l'extraction, le rendement, et l'évaluation de leur activité antioxydante et leur activité antimicrobienne.
- Le troisième chapitre est une présentation des résultats et leurs discussions.

Chapitre I :

Synthèse Bibliographique

I.1 Présentation de la plante

I.1.1 Historique

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontané depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant JC. **(Amourettiet, 1992).**

Les nomades arabes, dans leurs transhumances, en ont facilité la dissémination. En effet, en raison de la résistance de son écorce, qui en fait un fruit de longue conservation et peu susceptible d'être altéré durant le transport, la grenade a constitué, très tôt dans l'histoire, un des aliments de base des voyageurs et des caravaniers. D'autant plus que sa pulpe gorgée d'eau et légèrement acidulée permettait d'étancher la soif durant les longues traversées du désert.

La grenade a été introduite en Chine au début du IIème siècle avant JC, par le ministre Tchang K'ien, à l'occasion d'une mission en Inde. C'est donc dans l'ancienne Perse que débuta la culture du grenadier et c'est également de la Perse que le grenadier fut importé en Occident, sur les pourtours du bassin méditerranéen de l'Europe et de l'Afrique du nord. En effet, la plante fut introduite à Rome à la fin des guerres puniques, elle a été rapportée par les Romains après leur victoire sur les Carthaginois (**Boullard, 2001)**

La grenade porte le nom de pomme punique, c'est le *Malum punicum* de Pline, ou pomme de Carthage. Elle sera alors renommée *Punica granatum*

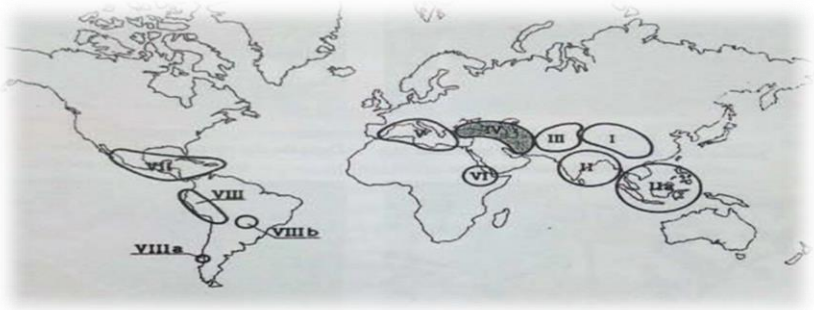


Figure01 : Centres d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur **Vavilov (Sanchez-Monge, 1974).**

I.1.2 Monographie de grenadier

I.1.2.1Etymologie et dénomination

Le grenadier « *Punica granatum* » vient du latin *« Malum granatum »* qui signifie «Fruit à petits grains» **(Cyr, 2017).**

Il a été décrit par **Linné** et introduit pour la première fois dans sa classification en 1753, qui a été révisée en 2003, par un groupe de botanistes,«*Angiosperm Phylogeny Group*» ou APG, donnant naissance à une nouvelle classification Phylogénétique **(Wald, 2009).** Le grenadier (*Punica granatum* L.), appartient à la famille des Punicaceae, division Magnoliophyta, classe Magnoliopsida et à l'ordre des Myrtales.

Tableau01 : Classification botanique de *Punica granatum* **(Wald, 2009).**

Règne	Plantae (plante)
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Rosidées
Ordre	Myrtes
Famille	Lythracea
Genre	*Punica*
Espèce	*Punica granatum* L.

I.1.3 Répartition géographique du grenadier

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc. On le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée. Deuxième en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique. Il est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride **(Courechet, 1879).**

I.1.4Description générale de 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 **(Garnier *et al*., 1961).**

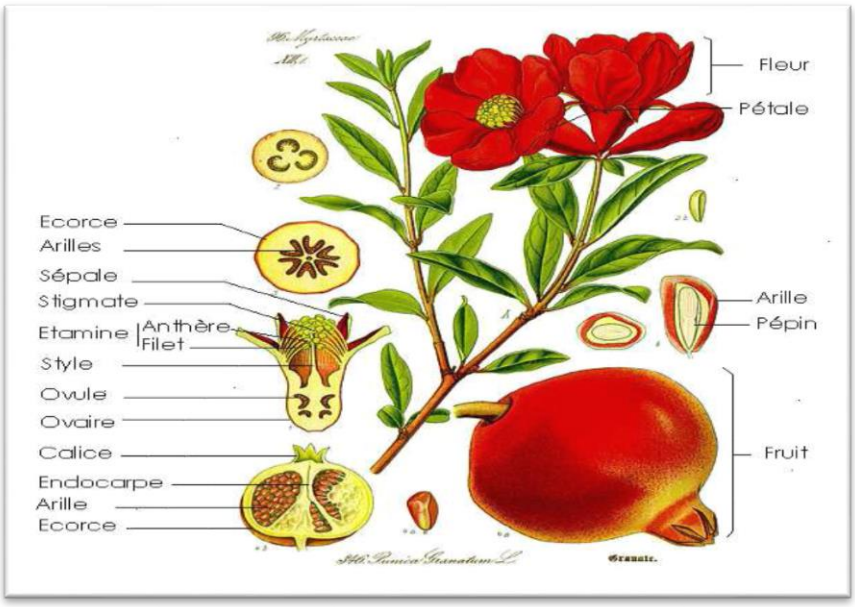


Figure 02 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum*) **(Deutsch and Schweiz, 1885)**.

I.1.4.1Les feuilles

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



Figure 03: Les feuilles de *Punica granatum*

I.1.4.2Les fleurs

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



Figure 04 : Fleur de *Punica granatum*

I.1.4.3Les fruits

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



Figure05 : Fruit de *Punica granatum*

I.1.4.4L'écorce

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



Figure 06 :L'écorce de *Punica granatum*



Figure 7 : Feuilles, Fleurs, Fruits et écorce de *Punica granatum*

I.1.5La culture du grenadier

La multiplication du grenadier peut se réaliser soit en semant les semences contenues dans les arilles ou bien par bouturage en mettant des rameaux dans le sol. Cette multiplication nécessite l'ajout des engrais et plusieurs sarclages afin de maintenir les racines humides. Le grenadier s'adapte à de nombreux climats, des tropiques aux régions tempérées chaudes, il tolère une large gamme de sols, mais il est nécessaire que ses racines soient au frais et largement irriguées, afin d'obtenir des fruits de bonne qualité et en grande quantité **(Afaq *et al*., 2005).**

Wald (2009), a montré que la récolte se fait à partir du mois d'Août et peut s'étaler jusqu'au mois de Décembre .Les fruits sont récoltés quand l'écorce de la grenade perd sa chlorophylle et se colore en rougeâtre ou jaune clair (selon les variétés), par ailleurs plus le fruit est lourd, plus la pulpe sera juteuse. Pour ce qui est de la conservation de la grenade, elle est simple du fait qu'il s'agit d'un fruit non climactérique. Comme tous les fruits

"exotiques", le fruit a besoin d'une température de conservation supérieure à 5°C pour éviter les maladies du froid et une humidité relative entre 80-85. Notons que ce fruit peut supporter jusqu'à 6 mois de stockage sans altération.

I.1.6Principaux constituants chimiques et la valeur nutritionnelle du grenadier

De manière générale, la composition de la partie comestible de la grenade est bien décrite. En ce qui concerne la peau du fruit et les pépins, seules certaines classes de molécules ont été relativement bien étudiées. Chacun de ses compartiments possède des constituants spécifiques dont les teneurs dépendent de la variété, la saison, le stade de maturité, ainsi que du lieu géographique et des conditions de culture (**Gil *et al*., 2000 ; AL-Maiman et Ahmad, 2002 ; Kulkarni et Aradhya, 2005 ; Mirdehghan et Rahemi, 2007; Schwartz *et al*., 2009**).

I.1.6.1Le jus

Le jus représente la partie la plus consommée de la grenade, c'est pour cette raison que sa composition est bien documentée. Avec une valeur énergétique comprise entre 62 et 83Kcal pour 100g, il est compose de 85,4% d'eau, de 14 à 19% de sucres (≈50% de glucose et50% de fructose dont sous forme de pectine : 1,4%), 1,7% de protéines (acides aminés majoritaires : proline, valine, méthionine) et 0,3 à 1,2% de lipides et d'acides organiques (acide citrique, malique, tartrique, fumarique et succinique notamment).Le jus de grenade est une source importante de micronutriments. En effet il a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont la vitamine C, B6, B9 et apporte également la vitamine E, B1, B2, B5. De plus il est naturellement riche en potassium, phosphore, calcium, magnésium, fer, zinc et cuivre **(Paul et Shaha, 2004 ; Waheed *et al*., 2004; Madrigal-Carballo *et al*., 2009 ; Viuda-Martos *et al*., 2010)**.

D'autre part, il contient une part non négligeable de phyto-micronutriments de type polyphénolique **(Aviram *et al*. 2008).** Les polyphénols majeurs sont les anthocyanes, avec notamment le delphinidé, la cyanidine et la pélargonidine. Les tannins hydrolysables y sontégalement présents, notamment la punicalagine et la punicaline, les acides ellagique et gallagique. Les flavan-3-ols (catéchine, EPI catéchine, quercétine, rutine), les acides

hydrox cinnamiques (acide caféique, chlorogénique, pcoumarique) et l'α-tocopherol sont présents en petites quantités.

I.1.6.2Les pépins

Les pépins sont composés d'une matrice rigide dont la composition est bien moins décrite. Elle comporte en majorité des lignines (35,3%), des protéines (13,2%), des pectines(6%) et des sucres (4,7%) ainsi que des acides hydrox cinnamiques **(Dalimov *et al*., 2003 ; Wang *et al*., 2004)**.

L'huile obtenue à partir des graines de grenade, se compose à 80% d'acides gras insaturés, essentiellement représente par l'acide punicique, mais également par les acides oléiques et linoléiques (**Wang *et al*., 2004**). Cette huile se compose aussi d'acides gras saturés, comme les acides palmitiques et stéariques **(Lansky *et al*., 2007)**. Elle contient aussi des composés mineurs tels que des tocophérols, stérols, stéroïdes et cérébrosides **(Tsuyuki *et al*., 1981).**

I.1.6.2 La peau

La peau de la grenade est composée d'eau (80%), de polysaccharides complexes (8%), dont des polysaccharides solubles (5%), représentés par des pectines et de l'hémicellulose.

Elle contient aussi des minéraux, dont le potassium, calcium, magnésium, phosphore et sodium (**Jahfar *et al*., 2003 ; Viuda-Martos *et al*., 2010**).

Sa particularité réside en sa richesse en polyphénols (entre 3 et 7%). C'est cette classe de molécules de la peau qui est la mieux décrite. Celle-ci est majoritairement composée d'ellagitannins (75 à 90% des polyphénols), notamment la punicalagine et la punicaline, mais elle contient également d'autres tannins hydrolysables tels que les acides ellagique et gallagique, des anthocyanines (les mêmes que pour le jus), des flavan-3-ols et flavonoïdes (Catéchine, EPI catéchine, lutéoléine, kæmpferol, quercétine, rutine), des acides hydroxycinnamiques (les mêmes que pour le jus) et des proanthocyanidines (**Ozcal et Dinc, 1993 ; Lansky et Newman,2007 ; Dell'agli *et al*., 2010**).

Tableau II : Composition biochimique et valeur nutritionnelle de la grenade **(Wald, 2009)**

composants	Quantité
Energie	68 Kcal soit 284 KJ
Eau	80,97 g
Protéines	0,95 g
Lipides	0,30 g
Acides gras saturés	0,12 g
Glucides	17,17 g
Fibres alimentaires	0,6 g
calcium	3 mg
Fer	0,30 mg
Magnésium	3 mg
Phosphore	8 mg
Potassium	259 mg
Sodium	3 mg
Zinc	0,12 mg
Cuivre	0,070 mg
Manganèse	0,12 mg
Iode	0,9 µg
Sélénium	0,6 µg
Vitamine B1	0,030 mg
Vitamine B2	0,030 mg
Vitamine B5	0,596 mg
Vitamine B6	0,105 mg
Vitamine B9	38 µg
Vitamine C	6,1 mg
Vitamine E	1 mg
Vitamine K	4,6 µg
Carotène	50 µg

I.1.7 Utilisation traditionnelle

La grenade a une longue histoire d'utilisation en médecine naturelle et holistique. En effet, elle a été utilisée pendant des milliers d'années pour guérir un large éventail de maladies dans le monde entier **(Wald, 2009).**

Hippocrate, considéré comme le père de la médecine, attribué au grenadier de nombreuses propriétés. Il recommande le jus et l'écorce de la grenade contre plusieurs maladies liées aux femmes. De plus les médecines traditionnelles égyptiennes considéraient l'écorce comme anthelminthique et mettaient à profit l'effet astringent du tanin contenu dans la grenade. Ainsi, le tanin des fruits aigres était prescrit comme fébrifuge et anti vomitif, celui des fruits sucrés comme adoucissant pour la toux **(Wald, 2009).**

L'intérêt thérapeutique du grenadier et de ses racines, fleurs et fruits a été réellement reconnu au XVIIIème et XIXème siècle par le milieu médical français mais également espagnol et américain **(Garnier *et al*., 1961)**.

De l'Afrique du Nord jusqu'en Inde, le jus de grenade, couramment utilisé dans les médecines indigènes, à la réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité. La pharmacopée et la médecine traditionnelle chinoise font aussi référence au grenadier pour guérir les maladies touchant les intestins **(Guillaume et Mach-Chieu, 1987).**

L'utilisation de la grenade est toujours marquée au XXIème siècle dans de nombreux pays comme le Guadeloupe afin de traiter de nombreuses maladies **(Boullard, 2001).**

I.1.8 Utilisation pharmacologique

Que ce soit comme aliment de qualité ou comme véritable produit de santé, la grenade dont l'utilisation médicale relève d'une tradition millénaire et dont les vertus ont confirmées aujourd'hui par la science, est de plus en plus appréciée. L'intérêt considérable qui existe actuellement sur les vertus médicinales et nutritionnelles de la grenade a commencé en l'an 2000 ; dès lors, plus de 250 études ont démontré que les substances protectrices de la grenade, ses polyphénols, peuvent protéger contre le stress oxydatif, et utilise pour les traitements et prévention contre plusieurs maladies, notons également que

ces propriétés thérapeutiques sont dues aux activités biologiques de la grenade **(Ahmed *et al.*, 2005)**.

Voici de manière détaillé, les principaux résultats d'une révision bibliographique concernant la littérature scientifique, ou sont décrites les diverses activités biologiques de la grenade qui ont été énoncées ci-dessus.

I.1.8.1 L'activité anti-inflammatoire

L'inflammation, la première défense physiologique du corps humain, peut nous protéger des lésions causées par les blessures ou les empoisonnements. Ce système de défense peut anéantir les micro-organismes infectieux, éliminer les irritations et maintenir les fonctions physiologiques dans leur état normal. Cependant, une surexposition aux inflammations peut causer certaines dysfonctions physiologiques, telles l'asthme et l'arthrite **(Lee *et al*. 2010)**.

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

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

I.1.8.2 l'activité antioxydante

L'oxydation « incontrôlée » qui se produit dans les tissus de notre organisme provoque le vieillissement, la dégénération et bien entendu la maladie. Cependant, notre organisme possède des antioxydants qui ont la capacité de le protéger contre les radicaux libres, tels les radicaux de l'oxygène et de l'azote ainsi que les radicaux lipidiques. Les

composés responsables du grand pouvoir antioxydant de la grenade et de ses produits dérivés ont été étudiés par de nombreux auteurs, aussi bien dans des modèles in vitro que dans des modèles in vivo.

L'activité antioxydante in vitro de la grenade et de ses produits dérivés a été évaluée par plusieurs auteurs **(Tezcan*et al*, 2009 ; Jacob *et al*., 2018**). **Tzulker*et al*. (2007)** ont déterminé que la haute capacité antioxydante de la grenade et de ses produits dérivés est due à la présence des punicalagines dans sa composition, et non pas aux anthocyanidines. Les substances particulières très actives qui composent la grenade agissent comme régulateurs de la cellule, et activent ainsi les systèmes de protection antioxydants du corps **(Jung et Curtay, 2010).**

Evidemment, d'autres organes peuvent aussi profiter de l'effet protecteur antioxydant des polyphénols de grenade : ainsi, de forts effets protecteurs antioxydants ont été constatés sur la muqueuse de l'estomac contre les ravages de l'alcool et de l'acide acétylsalicylique **(Ajaikumar *et al*., 2005)** ainsi que sur le foie **(Kaur *et al*., 2006).**

Madrigal-Carballo *et al*. (2009), ont suggéré que les composés phénoliques de la grenade éprouvent une réaction redox étant donné que les groupes hydroxyles des molécules phénoliques fournissent de l'hydrogène aux agents réducteurs.

Amarrowicz *et al*. (2004) affirment que l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à son habileté pour attraper les radicaux libres et les cations métalliques chélates.

I.1.8.3 Prévention des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont les maladies qui concernent le cœur et la circulation sanguine. Ainsi, lorsque le taux de cholestérol LDL (low-density lipoprotein) est trop élevé, le risque de ces maladies augmente. Il semblerait que l'oxydation du LDL contribue à l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires **(Heinecke, 2006).**

Plusieurs études ont été réalisées sur des animaux et sur des êtres humains avec divers produits en rapports avec la grenade pour déterminer son rôle dans la prévention et l'atténuation de l'athérosclérose et de l'oxydation du LDL. **Aviram *et al*. (2000)**, en utilisant des sujets masculins en bonne santé, ont analysé l'effet de la consommation du jus de grenade sur l'oxydation du LDL ; l'étude a déterminé que le LDL baisse et que

l'activité du HDL (high density lipoprotein) augmente. Ce même chercheur a attribué de nombreuses expériences sur des patients hypertendus, auxquels il a administré du jus de grenade. Ces études ont montré que la pression artérielle s'est vue diminuée et cette diminution a été attribuée au pouvoir antioxydant élevé des polyphénols de la grenade **(Aviram et Dornfeld, 2001 ; Aviram *et al*., 2004).**Son jus est considéré comme boisson rafraîchissante et comme tonique pour le système circulatoire, il a un effet astringent rafraîchissant et favorise l'irrigation sanguine **(Ahmed *et al*., 2005).**

Esmaillzadeh*et al.* (2006), ont administré du jus concentré de grenade à des patients hyper lipidémiques (niveau élevé de cholestérol et de triglycérides). A la fin de l'étude une diminution s'était produite sur le niveau de cholestérol total, sur le LDL, sur le quotient cholestérol total/HDL et sur le quotient LDL/HDL.

I.1.8.4 L'activité antidiabétique

Le diabète est une maladie liée à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie menant à une hyperglycémie ou une hypoglycémie.

Katz*et al.* (2007) ont montré que l'extrait aqueux de peau de grenade était significativement hypoglycémique, en augmentant le taux d'insuline et le nombre de cellules β pancréatiques chez les rats diabétiques induits par l'Alloxane. Cette étude suggère une application possible d'extrait de pelure de grenade pour le type 1 ainsi que le type 2 de la maladie du diabète.

En plus de l'effet de l'écorce de grenade sur le diabète, les fleurs du grenadier sont, depuis longtemps, reconnues par les médecines traditionnelles, pour leur action sur le diabète.Ils ont été utilisés en Perse pour le traitement du diabète gras **(Jung et Curtay, 2010)**.

En effet **Jafri *et al.* (2000)** ont déterminé que l'extrait éthanoïque de fleurs de grenadier a une réelle aptitude à faire baisser la glycémie en agissant sur la glycémie postprandial par un mécanisme similaire à l'acarbose (inhibiteur d'alphaglucosidases) et d'après la composition chimique des fleurs de grenadier, ils pensent que les principes actifs de ces extraits sont l'acide gallique et/ou l'acide asiatique.

I.1.8.5 Activité anticancéreuses et anti- tumorale

Un cancer (ou tumeur maligne) est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire (tumeur) anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme, de telle manière que la survie de ce dernier est menacée. Il faut noter que d'après plusieurs recherchesles extraits de grenade peuvent lutter contre plusieurs types de cancers à savoir le cancer de laprostate, du sein et du colon ainsi que d'autres **(Wald, 2009).**

Hong *et al.* (2008) ont démontré que le jus et les extraits provenant de la grenade constituent de puissants inhibiteurs de la croissance cellulaire et ils sont même plus puissants que certains polyphénols considérés de manière isolée ; cela suggère un effet synergique des photochimiques présents dans la grenade et dans ses extraits. En effet, un extrait de grenade appliquée comme prétraitement topique diminue l'incidence d'une tumeur chez la souris de100 à 30, augmentant en outre la latence dans le développement de la tumeur de 9 à 14semaines **(Afaq *et al.*, 2005).**

Albretch *et al.* (2004) ont étudié l'effet de l'huile de grenade, des polyphénols de l'écorce, des membranes et du jus fermenté sur le cancer de la prostate. Tous ces agents, de manière séparée, ont inhibé la prolifération in-vitro des cellules cancéreuses. De plus, **Hong *et al.* (2008)** ont prouvé que le jus et les extraits de grenade ont une grande capacité de stimuler l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate.

Suite à ce qui a été exposé ci-dessus, nous pouvons conclure que la grenade et ses produits dérivés ont un effet bénéfique sur les maladies cancéreuses et tumorales dû à leur teneur élevée en composés phénoliques, tels les anthocyanosides, l'acide ellagique et les punicalagines. Il est important savoir que ces polyphénols sont question de prévention et de traitement, mais non pas de guérison du cancer ou des tumeurs. La grenade et ses produits dérivés, dû à leur composition phytochimique, sont des produits très recommandables pour la prévention et le traitement du cancer.

I.1.8.6 L'activité antimicrobienne

Un antimicrobien est une famille de substances qui tuent ou ralentissent la croissance des microbes. Ces derniers sont de plus en plus résistants aux actuels traitements antibactériens, antifongiques et antiviraux, ce qui pousse les chercheurs à découvrir de nouveaux principes actifs. En effet, l'activité antimicrobienne de la grenade et de ses

dérivés a été démontrée dans de nombreuses études qui ont constaté l'inhibition de l'activité de nombreux microorganismes.

Braga *et al.* (2005) ont tenté de montrer l'intérêt de l'association de substances végétales aux traitements antibiotiques afin de réduire ces résistances. Les résultats de cette étude montrent clairement que des extraits végétaux, comme l'extrait de grenade, peuvent permettre d'améliorer l'action antibactérienne de certains antibiotiques et lutter contre l'apparition de souches bactériennes résistantes aux traitements. Il a été observé que des extraits ou des composés purifiés, issus de diverses parties du grenadier, possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antihelminthiques. Il semble que les principes actifs de *Punica granatum* sont ses tanins et ses alcaloïdes **(Elodie, 2009).**

Reddy *et al.* (2007) ont démontré que différents extraits de grenade dans différentssolvants présentent une activité antimicrobienne significative contre *E. coli, Pseudomonasaeruginosa, Candida albicans, Cryptococcus neoformans et S. aureus*. De plus **Al-Zoreky,(2009)** a démontré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur dela croissance de *Listeria monocytogène*, *S. aureus, E. coli et Yersinia enterocolitica*. Une étude, réalisée par **Vasconcelos et Sampaio, (2006)** compare l'utilisation d'un gel à base de miconazole, antifongique imidazolé, à celle d'un gel contenant de la poudre de péricarpe de grenades, sur l'adhésion de microorganismes responsables d'infections buccodentaires.

Trois types de bactéries, *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis et Streptococcus mitis*, ainsi qu'un type de levure, *Candida albicans*, sont soumis, seuls ou en associations, à l'action de ces gels. Ils mesurent alors la concentration minimum en principe actif qui permet d'inhiber l'adhésion de ces microorganismes à un support en verre, en présence de 5% de saccharose.

Les résultats de cette étude ont montré que le gel à base de péricarpe de grenade est plus efficace que celui à base de miconazole sur chacun de ces microorganismes analysés grâce à la présence de punicalagine et ils ont noté également que la peau de grenade se montre très efficace contre *Candida albicans* **(Wald, 2009).**

Neurath *et al.* (2004) ont analysés l'action de différents jus de fruits, et plus particulièrement celle du jus de grenade, sur la reconnaissance et l'entrée dans la cellule hôte, de différents sous-types de VIH-1. Les résultats de cette étude montrent que, in vitro,

le jus de grenade adsorbé sur de l'amidon de maïs permet de bloquer la fixation du virus sur ses cellules cibles.

En effet, il semble que le complexe jus de grenade/amidon de maïs, se fixe sur la protéine gp120 du virus, empêchant ainsi l'adhésion aux lymphocytes et aux corécepteurs et donc la pénétration à l'intérieur de la cellule hôte. Le spectre d'action de la grenade contre les virus ne semble pas se limiter au virus du SIDA.

En effet, plusieurs études ont montré des résultats encourageants sur d'autres virus; l'action des extraits de péricarpe de grenade qui se montrent actifs contre les troisvariantes du virus de l'herpès simplex de type 1 ainsi que l'action des extraits alcooliques de grenades entières qui présentent une forte activité antivirale contre le virus de l'influenza, en cause dans tous les types de grippes, notamment dans la grippe aviaire **(Seeram etSchulman, 2006).**

En général l'action inhibitrice élevée de la grenade et de ses produits dérivés est attribuée à la présence de composés polyphénoliques à savoir les tanins et les anthocyanosides.

I.2 Activité antioxydante

I.2.1 Radical libre

Il s'agit d'un atome ou d'une molécule qui contient un (ou plusieurs) électron(s) non apparié(s), comme conséquence de la perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi-liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électron(s) **(Halliwell et Gutteridge, 1999).** Le tableau ci-dessous résume les différents radicaux libres.

Tableau III : les différents radicaux libres

Les radicaux libres	définitions	Références
Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS)	Peuvent être des radicaux libres (comme O2– : anion superoxyde, OH : radical hydroxyle) ou des molécules non radicalaires mais néanmoins hautement instables (comme O2 singulet).	**(Berger, 2006).**
Espèces réactives de l'azote (ERA ou RNS	Espèces réactives du NO sont essentiellement produites par la NO-synthase.	
Radicaux soufrés	Ont pour origine l'oxydo-réduction à un électron du couple disulfure/dithiol de protéines ou de petits peptides.	**(Chatgilialoglu et Asmus, 1990).**

I.2.2 Rôles biologiques des radicaux libres

Les radicaux libres jouent des rôles essentiels dans le bon déroulement de la réaction immunitaire par l'activation de la NADPH oxydase, l'action des superoxydes dismutases (SOD) et la NO Synthase (NOS) qui aboutissent à l'O•-, H2O2, HO• et autres radicaux libres. La présence de chlore donnera la naissance à l'acide hypochlorique HOCl, c'est l'oxydant microbicide le plus puissant dans la phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires. Les radicaux libres peuvent aussi air en tant que molécules de signal et intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire et participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation **(Favier, 2003).**

I.2.3 Stress oxydant

Les caractéristiques physico-chimiques (pH, potentiel redox) du milieu intracellulaire sont régulées. Ainsi le pH est toujours de l'ordre de 7, sauf dans certains organites. De même le potentiel redox est toujours légèrement négatif, ce qui assure, entre autre, la stabilité de fonction thiol **(Schafer et Buettner, 2001).** Or, les radicaux libres du milieu vivant sont principalement oxydants. En conséquence, lorsqu'ils sont formés par une

cellule, le potentiel redox intracellulaire augmente : c'est le stress oxydant **(Aruoma et Halliwell, 1998 ; Cutler *etal*., 1995)**

Ou c'est la perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défaillante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé stress oxydant **(Biesalski *et al*., 1997).**

Ce déséquilibre pro-oxydant/antioxydant peut avoir une origine exogène : molécules oxydantes, toxines telles que les métaux lourds toxiques ; ou une origine endogène : disfonctionnements de certaines sources de production et systèmes d'élimination des ROS (Figure 08) **(Favier, 2003; Servais , 2004)**.

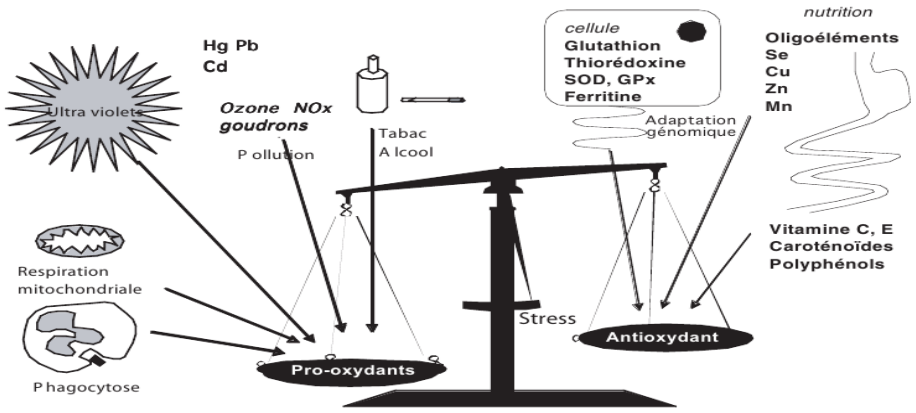


Figure 08 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants

(Favier, 2006).

I.2.4 Stress oxydant et pathologies humaines

Les radicaux libres réagissent avec les tissus voisins causant des lésions oxydatives par extension de proche en proche, lésant les acides nucléiques, les lipides, les protéines et les hydrates de carbone **(Berger, 2006).** Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement et la dégradation des cellules et des tissus **(Bonnet *et al.*, 2010).**

La recherche de ces deux dernières décennies a montré que de nombreuses pathologies humaines sont causées ou favorisées par le stress oxydant **(Gutteridge, 1993):** cancer, cataracte, sclérose latérale, syndrome de détresse pulmonaire aigu, oxydation des LDL, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré et inflammation. Il sera aussi l'un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires **(Favier, 2003).**

I.2.5 Antioxydant

Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient **(Halliwell et Gutteridge, 1990).** Ces antioxydants peuvent être de deux natures différentes : des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques **(Leverve, 2009).**

Donc, pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes **(Haleng *et al*., 2007).**

Ces divers antioxydants ont des mécanismes de défense antioxydante différents **(Tableau VI),** pour préserver le bon fonctionnement de la cellule, parce que lorsque les défenses antioxydantes sont affaiblies ou dépassées, le stress oxydatif peut provoquer l'inactivation enzymatique et la peroxydation lipidique **(Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Farombi *et al.*, 2007; Yildirim *et al.*, 2011; Mélila *et al.*, 2012)**

Tableau VI : les différents mécanismes de l'activité antioxydante

Mécanismes	Références
Piégeage des radicaux	**(Garcia-Lafuente *etal*., 2009)**
Prévention des attaques radicalaire	**(Hanaski etal., 1994)**
Promouvoir l'activité des enzymes antioxydantes	**(Alia *etal*., 2006)**
Inhibition de l'activité des enzymes prooxydantes	**(Hong *et al*., 2001)**
Amélioration des molécules antioxydantes endogènes	**(Alia *et al*., 2006)**

I.3Activité antimicrobienne

I.3.1 Généralité

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

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

I.3.2 Rappel sur les bactéries

Une bactérie est un microbe formé d'une seule cellule, visible au microscope, appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal.

Comme toute cellule, les bactéries sont constituées d'un noyau, isolé ou diffus, un protoplasme contenant des granulations et des vacuoles, une paroi parfois d'une capsule.

Certaines bactéries sont mobiles grâce à des cils vibratiles. Selon leur mode de nutrition et leur comportement vis-à-vis de l'oxygène, les bactéries sont classées en aérobies et en anaérobies.

Les bactéries se reproduisent selon deux modes :

- ✓ La division simple ou scissiparité ;
- ✓ La sporulation,

La spore représentant la forme de résistance et de dissémination du germe. Pour croître les bactéries doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions physicochimiques favorables qui leur sont nécessaires et les aliments couvrant leurs besoins énergétiques élémentaires et spécifiques. Sur le plan pratique, ces besoins sont satisfaits dans des milieux élaborés par l'homme en vue d'étudier les bactéries et sont appelés de ce fait, milieux de culture **(Leclerc *et al.*, 1995 ; Madigan *et al.*, 1997 ; Marc *et al*,. 2001).**

I.3.3 Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

I.3.3.1 *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec *staphylos*), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.

Les *staphylocoques* sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano – muqueuses des mammifères.

Il existe une certaine relation entre les espèces de *staphylocoques* et l'hôte qui les héberge. *Staphyloccocis epidermidis* est l'espèce la plus fréquente et la plus abondante sur les surfaces cutanées de l'homme. *Staphyloccocis* aureus est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle. Les *staphylocoques* ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *Staphyloccocis aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies *bulleuses,* etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entérocolites post-antibiotiques), septicémiques. *Staphyloccocis epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales **(Leclerc *et al.*, 1995).**

I.3.3.2 *Pseudomonas aeroginosa*

Ce genre appartient à la famille des *Pseudomonadaceae.* Les bactéries de cette famille sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les Pseudomonas cultivent facilement sur milieux usuels, en aérobiose, à la température de 30°C, certaines espèces comme Pseudomonas *aeruginosa* sont capables à 41°C et même 43°C ; ce caractère étant utilisé pour le diagnostic. La production d'un pigment est assez commune dans le genre. Deux sont particulièrement fréquents et utiles pour la reconnaissance des espèces: la pyocyanine, pigment phénazinique, soluble dans l'eau et le chloroforme, spécifique de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*; la pyoverdine, ou pigment vert fluorescent, soluble uniquement dans l'eau et élaborée en particulier par Pseudomonas *aeruginosa et Pseudomonas fluorescens.* Ces bactéries sont capables d'utiliser une variété très large de substrats comme source de carbone et d'énergie.

Ceux-ci comprennent les glucides, lipides, acides aminés, acides organiques, et aussi un grand nombre de corps aromatiques benzéniques, phénoliques, terpénique, des stéroïdes.

Dans le genre Pseudomonas quelques espèces se signalent à l'attention, du fait de leur pouvoir pathogène opportuniste. *Pseudomonas aeruginosa*, l'espèce type, est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C, contrairement à *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. Fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier

Il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées…). De même qu'il est *phytopathogène* avec beaucoup d'autres espèces du même genre **(Leclerc *et al*., 1995).**

I.3.3.3*Escherichia coli*

Ce genre comprend 5 espèces, mais *Escherichia coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents.

Escherichia coli, un hôte commun de l'intestin de l'homme (108/g de selles), et des animaux ; elle est recherchée à ce titre, comme genre témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments.

A l'intérieur de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées) leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *Escherichia coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *Escherichia coli* entérotoxinogène (turista), *Escherichia coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *Escherichia coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *Escherichia coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur).

D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes **(Leclerc *et al.*, 1995).**

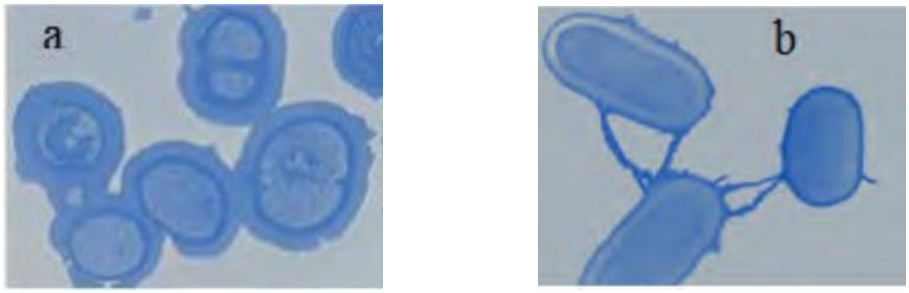


Figure 09 : Aspect morphologique des microorganismes étudiés **(Pieri et Kirkiacharian, 1992) a**: Escherichia*coli*, **b:** Pseudomonas *aerogenosa*

I.3.4 Les Antibiotiques

Pour de multiples raisons, il est apparu utile et, dans certains cas indispensable, de contrôler le développement des microorganismes, car certaines bactéries sont hautement pathogènes pour l'homme ou l'animal et qu'il fallait tout naturellement se protéger de leurs effets néfastes et empêcher la transmission des maladies infectieuses. Les bactéries ne sont

pas seulement nuisibles pour l'homme et l'animal, mais d'autres produits, substances ou matériaux peuvent être détruits ou altérés sous l'effet de leur multiplication : détérioration des produits alimentaires ; plusieurs monuments d'un grand intérêt historique sont dégradés (maladie de la pierre); les canalisations aussi peuvent être perforées.

Alors, il est devenu indispensable à l'homme de mener une lutte contre l'envahissement des microorganismes, pour conserver ses biens, son potentiel industriel, son patrimoine artistique et pour "protéger son existence" même. Les moyens de lutte sont nombreux, les agents physiques (température, rayonnements…), les agents chimiques (métaux lourds, chlore et dérivés, alcools…) sont très actifs mais nocifs, aussi bien pour les bactéries que pour les cellules humaines ou animales.

Mais il y a d'autres agents, possédants une "toxicité sélective": ils s'opposent à la multiplication bactérienne sans nuire aux cellules de l'hôte, et sont utilisés pour cette raison en thérapeutique, ce sont les "Antibiotiques" **(Leclerc *et al.*,1995).**

I.3.5Principe de base d'une antibiothérapie

La prescription et la dispensation d'un antibiotique doivent être rigoureuses. Il est donc nécessaire de convaincre le patient de la durée, de la posologie et des précautions d'emplois de l'antibiotique (ATB).

C'est sur la base d'un diagnostic clinique complété par des connaissances biologiques que vont se fonder la décision et le choix d'une antibiothérapie **(Pichard *et al.*, 2002).**

I.3.6Résistance des antibiotiques

La résistance d'un germe peut exister, si le germe appartient à la même espèce (résistance naturelle) alors la résistance acquise n'intéresse que certaines souches. La résistance acquise d'une espèce bactérienne à un antibiotique se développe au fur et à mesure que l'antibiotique est administré. Elle se traduit par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice.

Dans 10%, cette résistance acquise est due à des modifications génétiques de la bactérie, alors que dans 90% des cas cette résistance est due à l'acquisition de plasmides qui sont des molécules d'ADN se trouvant dans le cytoplasme des bactéries. Le transfert des plasmides se fait par conjugaison, par mobilisation ou par transformation.

La résistance plasmidique permet à la bactérie d'élaborer des enzymes capables de détruire la molécule d'antibiotique par exemple des ß lactamases pour les ß lactamines, des adenylases-acétylase-phosphorylases pour les aminosides, les tétracyclines, et les sulfamides.

Cette résistance des germes aux antibiotiques explique l'importance de l'antibiogramme qui permet de choisir l'antibiotique le plus efficace vis à vis d'un germe déterminé et la mise en évidence des germes multi-résistants dont la dissémination doit être évitée en milieu hospitalier **(Berche *et al*., 1989 ; Hamza, 1993 ; Fatorrusso *et al*., 2001).**

I.3.7 Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent :

- Sur la synthèse de la paroi bactérienne : la paroi est constituée de mucopeptide. Les antibiotiques bloquent la transpeptidase qui intervient pour synthétiser la paroi des cellules-filles en provoquant la formation de paroi incomplète aboutissant à l'éclatement de la bactérie. **Exemples** : ß lactamines, la bacitracine, la vancomycine.

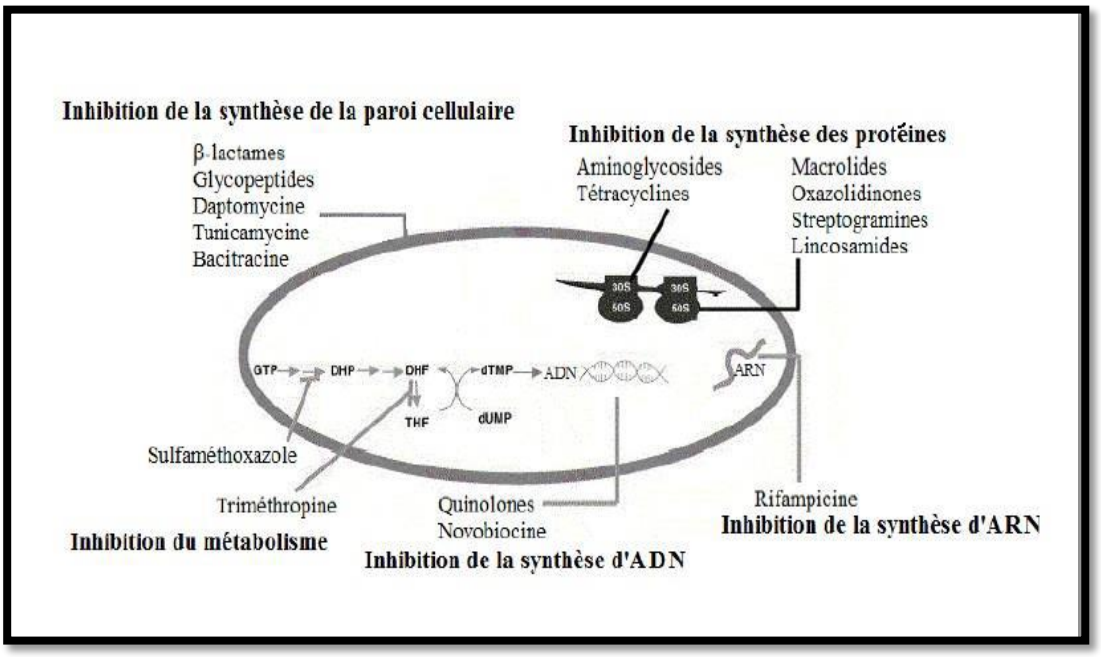


Figure 10 : Mode d'action des antibiotiques **(Singh et Barrett, 2006).**

- Sur la structure de la membrane cytoplasmique. Les antibiotiques altèrent la membrane cytoplasmique et la dissocient ce qui entraîne une fuite du cytoplasme. **Exemple** : polymyxine et la colistine.
- Sur la synthèse des protéines bactériennes. L'ADN du noyau transmet à l'ARN messager (ARNm) le code de synthèse des protéines.Cet ARNm vient en contact du ribosome rencontré l'ARN de transfert (ARNt) qui apporte les aminoacides. Certains antibiotiques empêchent la libération de l'acide aminé par l'ARNt. **Exemple** : les tétracyclines.

D'autres gênent la lecture du code de synthèse sur l'ARN messager. **Exemple** : les aminosides. Le chloramphénicol inhibe l'enzyme qui permet aux acides aminés codés de s'assembler en polypeptide utile.

- Sur l'ADN nucléaire ces antibiotiques agissent en gênant la réplication de l'ADN. **Exemple** : rifamycine, l'acide nalidixique **(Duval *et al*., 1985).**

I.4 Métabolite secondaire

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires.

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour la hémi-synthèse de composés actifs. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs au XIXème siècle, a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d"une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement.

Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. A heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montrées que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. **(Brzozowska *et al*., 1976).**

Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue :

- Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins.
- Les alcaloïdes, renferme un atome d'azote dans la structure. Parmi ces derniers, certains relèguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine.

- Les mucilages : Ces sont des polymères complexes de fructose, d'acide glucorinique et d'acide manuronnique. Les mucilages sont des mélanges colloïdaux qui gonflent avec l'eau (agar agar).
- Les gommes et les résines : Ces sont des substances produites par la plante à la suite d'une blessure.
- Les huiles essentielles : Ces sont des liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, ces essences sont très volatiles et non miscibles à l'eau.
- Les latex : Ces sont des substances sécrétées ou fabriquées par des cellules laticifères (vraies ou anastomosées) et qui ont la particularité de se solidifier au contact de l'air.

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes **(Epifano *et al*., 2007).**

I.4.1Composés phénoliques

Le terme« polyphénols» désigne l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques **(Fleuriet, 2005).**

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

I.4.2Acides phénols et les coumarines

I.4.2.1Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales **(Psotova *et al*., 2003).**

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

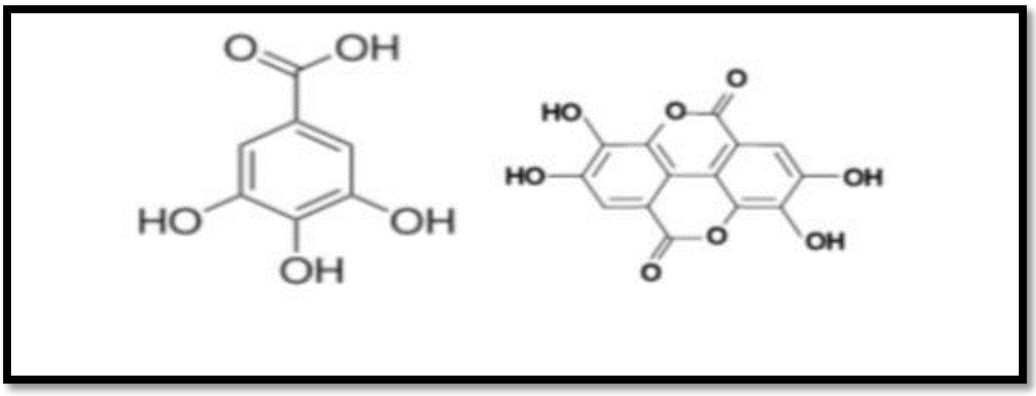


Figure 11 : Acide gallique **figure 12:** Acide éllagique

On distingue deux principales classes d'acide phénolique ; les dérivés de l'acide benzoïque **(Guignard, 1996)** et les dérivés de l'acide cinnamique **(Malagas, 1992)** Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents **(Fleuriet *et al*., 2005).**

I.4.2.2 Les acides benzoïques

Sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides phydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques ont des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, il est rencontré dans la nature surtout sous forme de dimère **(Ribereau-Gayon, 1968).**

I.4.2.3Les acides cinnamiques

Ils possèdent une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide o-coumarique, l'acide caféique et l'acide cinnamique **(Ribereau-Gayon, 1968).**

Les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxylés, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide o-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent respectivement aux acides p-coumarique, caféique et férulique. Signalons également la fraxétine et la daphnétine **(Dean, 1963).**

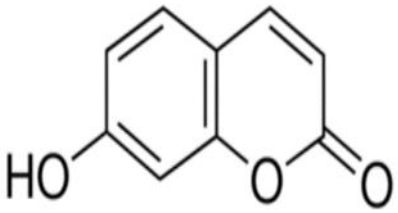


Figure 13 : Umbelliférone

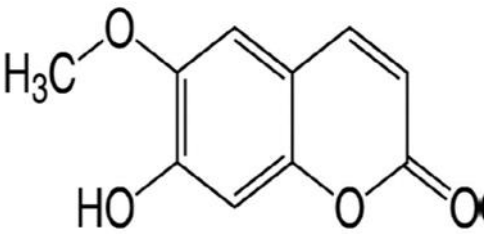


Figure 14: Scopolétine

I.4.2.4 Flavonoïdes

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 **(Gabor, 1988).** Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C6 (A et B), reliés par une chaine en C3 **(Bruneton, 1999)**

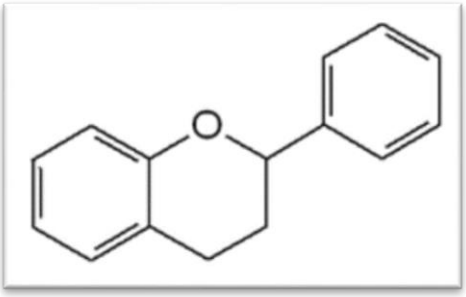


Figure 15 : Squelette de base des flavonoïdes.

Squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides phydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentisiques Les acides protocatéchiques et galliques ont des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, il est rencontré dans la nature surtout sous forme de dimère **(Ribereau-Gayon, 1968).**

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines **(Medic-Sanic *et al*., 2004).**

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

I.4.2.4 Flavonols

Les flavonols (hydroxy-3 flavone) sont largement répandus et incolores, ils sont caractérisés par la présence d'un carbonyle en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Les flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs en jaune primevère **(Guignard, 1996).**

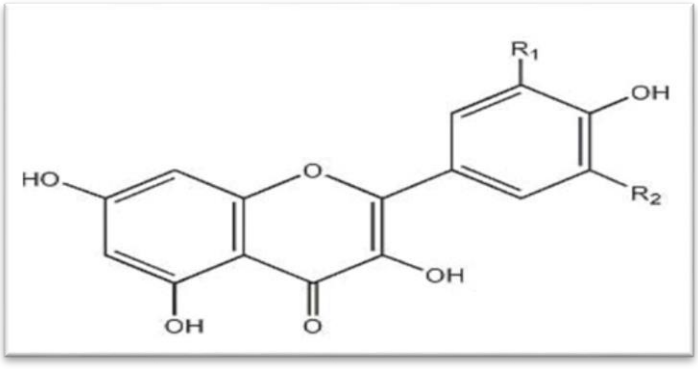


Figure16 : squelette de flavonols

I.4.2.6 Anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et Kuanos, bleu violet) est un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés **(Guignard, 1996).** Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capable d'absorber la lumière visible, sont Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu, elles donnent de la couleur aux fleurs et aux fruits, et elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau **(Harbone et Grayer, 1988).** Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule, L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.

I.4.2.7Tanins

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

• Les tanins condensés, formés de pro-anthocyanidines (sous forme d'oligomères)

• Les tanins hydrolysables, esters des acides-phénols et de glucose. Des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange **(Brouillard, 1986).**

I.4.3 Pouvoir antioxydant des composés phénoliques

Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des pro-oxydants **(Spiller, 2007)**.

La structure des composés phénoliques confèrent une activité antioxydante aussi importante Les groupes hydroxyle des 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. **(Spiller, 2007)**

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes **(Fleuriet *et al.*, 2005).** Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) et 2.2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine. Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation **(Bruneton, 1999).**

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

L'étude expérimentale a été réalisée sur les écorces, d'un fruit local très connue qui est la grenade (*Punica granatum* L.). La plante a été collectée en septembre 2021 dans un endroit naturel loin de la pollution situé dans la région de Kser Boukhari de la wilaya de Médéa. Le travail de recherche accompli dans la présente étude a été effectué au niveau du Laboratoire pédagogique du département des Sciences département de biologie, université Yahia Farés, Médéa.

II.1.2 Séchage, broyage et tamisage

Les écorces ont été séchées à l'air libre et à température ambiante puis broyées grâce à un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre fine **(Figure17)** puis tamisées par un tamiseur, la poudre obtenue a été conservée dans des sacs en papier et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'utilisation.



Figure 17 : Poudre d'écorce de *Punica granatum***(Originale, 2022)**

II.1.3 Matériel de laboratoire

Tableau V : Produits chimiques et milieux de culture utilisés

Produits	Noms	Utilisations
solvants	Ethanol	Préparation de l'extrait de l'écorce
	méthanol	
Réactifs	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Activité antioxydante
	Acide ascorbique	
	Acide gallique	
Milieu de culture	Mueller-Hinton (MH)	Activité antimicrobienne

II.1.4Le matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence qui proviennent de la faculté des sciences biologiquesde Médéa. Les souches utilisées sont représentéesdans le tableau suivant :

Tableau VI: les souches bactériennes utilisées

Souches bactériennes	Gram
***Escherichia coli* ATCC**	Gram-
Pseudomonas aeruginosa	Gram-
Staphylococcus aureus	Gram+
***Bacillus cereus* ATCC**	Gram+

II.1.5 Les antibiotiques utilisés

On utilise l'antibiotique commun entre les 4 souches bactriennes qui est **« AMOXYPEN »**



Figure18 :L'antibiotique « AMOXYPEN » **(originale, 2022)**

II.1.6 L'appareillage

Le matériel utilisé pour réaliser nos manipulations est :

1. Une étuve.
2. Un réfrigérateur à 4°C.
3. Un broyeur électrique.
4. agitateur
5. Un spectrophotomètre.
6. Un dessiccateur infrarouge.
7. Un autoclave.

II.2 Méthodes

II.2.1Préparation de l'extrait de l'écorce de *Punica granatum*

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide des solvants sélectifs, traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales. Les produits ainsi obtenus sont relativement impures sous forme de liquides, semi-solides, ou poudres exclusivement destinés à un usage orale ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales **(Handas, 2008)**.

Dans la présente étude, la méthode utilisée est celle de l'extraction par macération, en utilisant l'eau et deux solvants l'éthanol et le méthanol afin d'obtenir des extraits enrichis en molécules d'intérêt (composés phénoliques).

❖ **Mode opératoire**

L'extraction a été effectuée par macération de 20gde la poudre du matériel végétal dans 200ml d'eaux distillé pendant 2h.L'ensemble a subi une agitation pendant 24h à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'extrait est donc récupéré par une filtration à l'aide d'un papier filtre (papier wattman), le filtrat est a été préservé à l'étuve à température 65°c pendant une semaine.

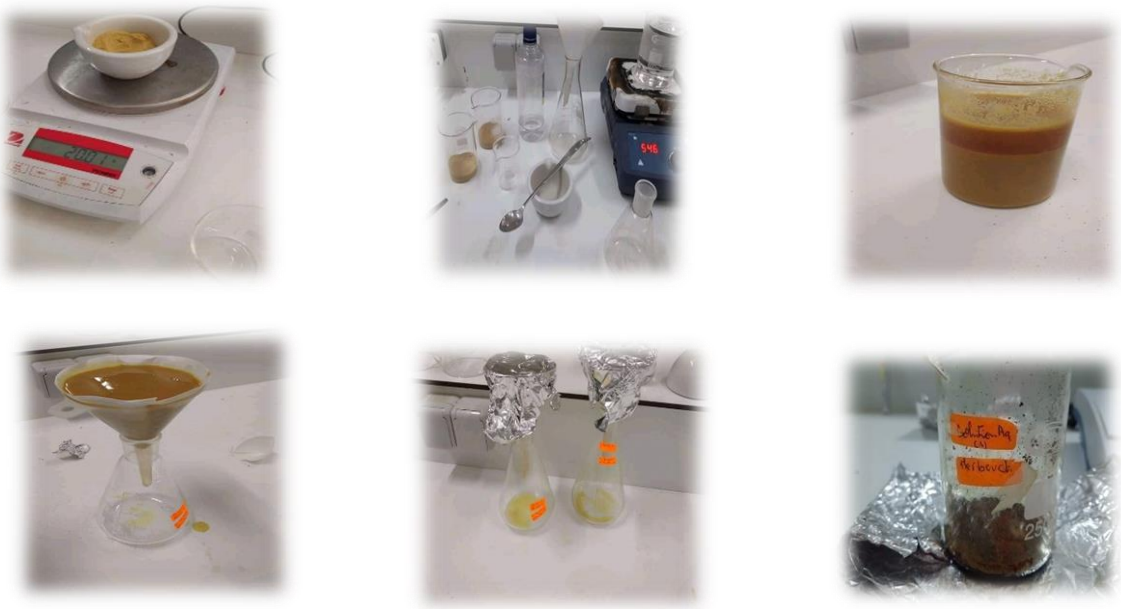


Figure19 : Les étapes de préparation de l'extrait aqueux **(Originale, 2022)**

20g de poudre a été macéré dans 200ml d'éthanol et méthanol après ont été laissé dans l'agitateur pendant 24h. L'extrait a été récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre. Et a été préservé à l'étuve à température 65°c pendant 5 à7jours.

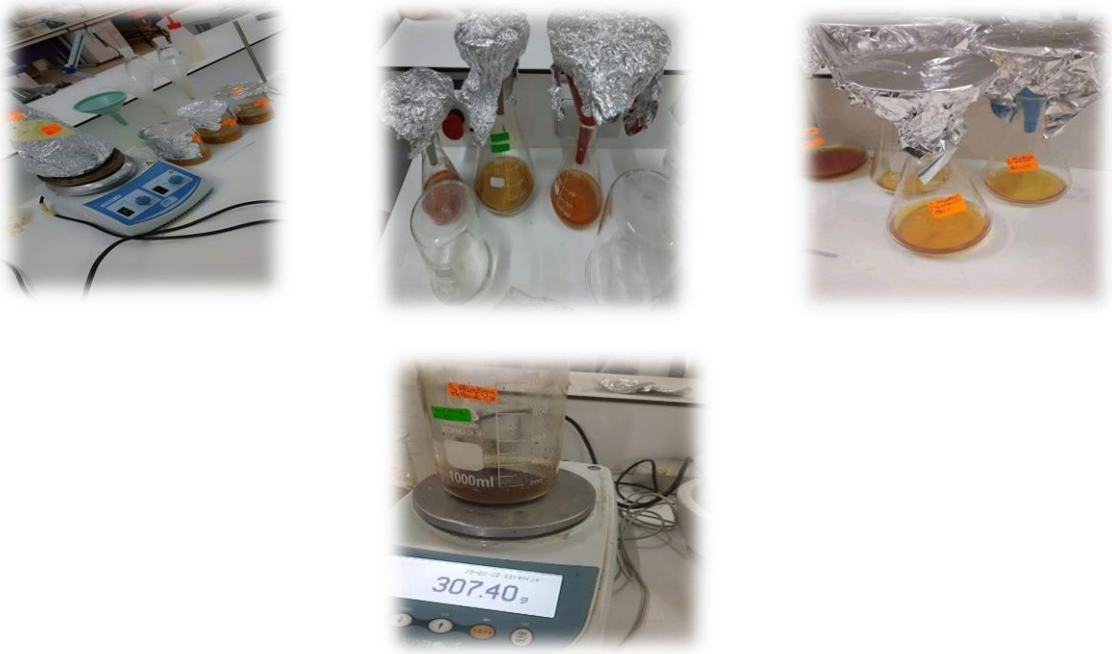


Figure 20 : Les étapes de préparation de l'extrait alcoolique **(Originale, 2022)**

II.2.2Protocol extrait aqueux et alcoolique (méthanol et éthanol)

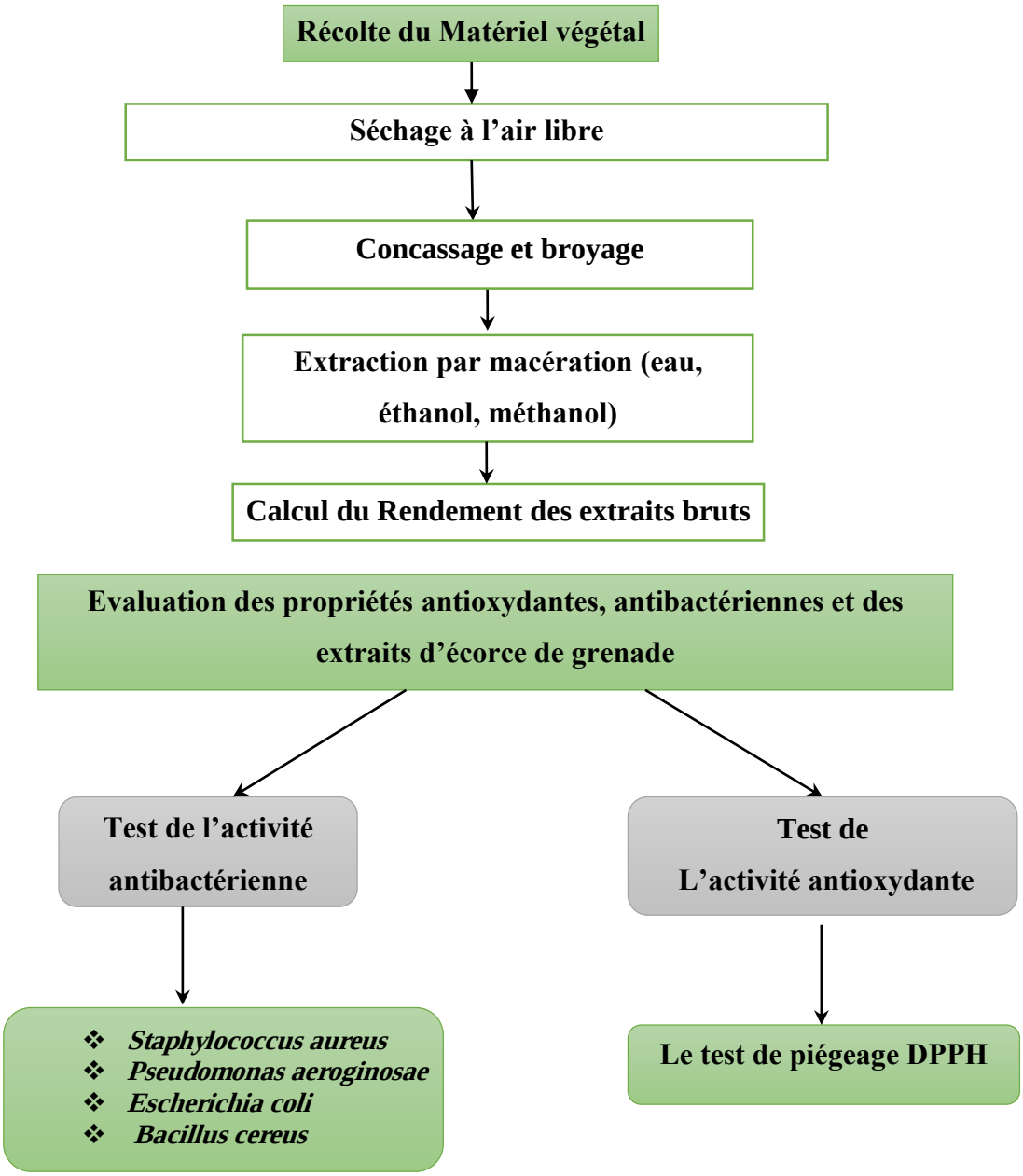


Figure21 : Protocole de préparation de la matière végétale et des extraits bruts de l'écorce de fruit grenade *Punica granatum* **(Originale, 2022)**

II.2.3 Détermination du rendement d'extraction

Le rendement en extrait sec exprimé en pourcentage est calculé d'après la formule Suivante :

$$R\% = (PES / PE) \times 100$$

R% : rendement en pourcentage

PES : poids de l'extrait sec (g)

PE : poids de l'échantillon poudre (g)

II.3 Tests des activités biologiques

II.3.1Test de l'activité anti-oxydante

Le pouvoir antioxydant de nos échantillons a été testé en employant le test de piégeagedu radical libre DPPH. Le principe de ce test est fondé sur le pouvoir des antioxydants quijouent le rôle des piégeurs de radicaux libres. En présence de ces antioxydants : soitsynthétiques ou naturels (dans notre cas c'est nos échantillons), le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl), qui est caractérisé par sa couleur violette, se réduit en 2,2-diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune **(Maataoui*et al.* 2006).** On peut résumer laréaction par le schéma représenté dans la figure suivante :

(DPPH) + H-A→DPPH-H + A

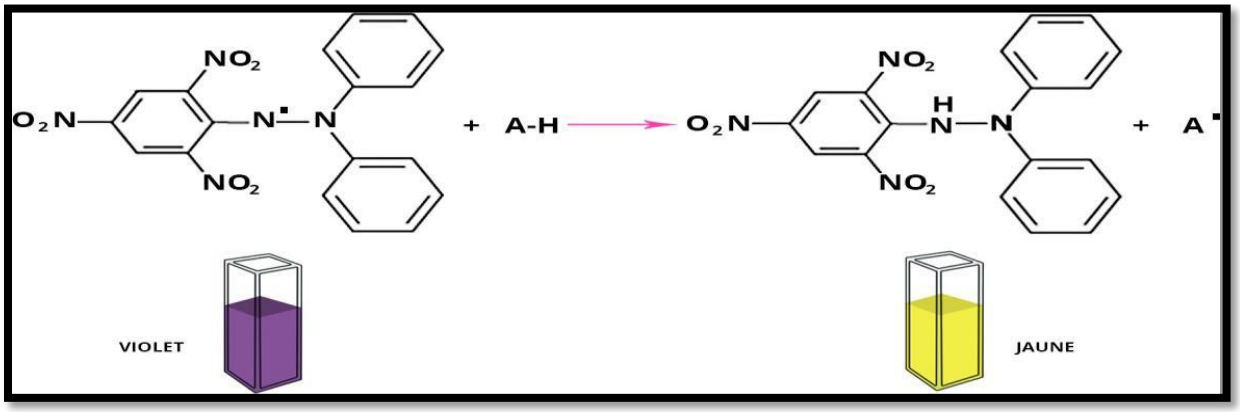


Figure22 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (**Amié, 2003).**

DPPH: 2.2 diphényle- 1- picryl-hydrazyl

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

A : le composé oxydé après la réduction de DPPH

- **Mode opératoire**

Dans notre étude, ce test a été évalué suivant le protocole de **Blois (1958)**. La solution du DPPH est préparée à l'avance par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Brièvement, 0,5 ml d'une solution méthanoïque de DPPH (0,2 mM) a été mélangé avec 1,5 ml de différentes concentrations des extraits de la plante (0,5 ; 1 ; 2 ; et 2,5mg/ml). Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes.

Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc composé de 0,5 ml de MeOH et de 1,5 ml de chaque extrait. Un contrôle négatif est composé de 1,5 ml méthanol et 0,5 ml de solution méthanoïque de DPPH. Des solutions d'antioxydant de référence (acide ascorbique, acide gallique) sont également préparées dans les mêmes conditions pour servir de témoin positif. Les échantillons, les témoins (acide gallique, acide ascorbique) et le blanc sont préparés dans les mêmes conditions opératoires.

Chaque test est répété trois fois, en suivant la méthode décrite par **(Ait Braham et Belhamel, 2016).**

Pourcentage de l'activité anti radicalaire est estimé selon l'équation ci-dessous :

%de l'activité anti radicalaire = (A1- A2 / A1) x 100

A1 : Absorbance du témoin négatif sans extrait

A2 : Absorbance en présence de l'extrait.

II.3.1.1 Evaluation du potentiel anti-radicalaire par le calcul de l'IC50

L'IC50 (Concentration inhibitrice 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les IC50 sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés **(Torres *et al.*, 2006).** La valeur d'IC50 la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de l'IC50 est exprimée en µg/ml.

Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne des trois essais. (3 répétitions pour chaque concentration).

En utilisant différentes dilutions des extraits : 20%, 40% ,60% et 100% et de standard acide gallique et acide ascorbique.

II.3.2 Test de l'activité antimicrobienne

Le test antibactérien a pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait vis-à-vis de différentes souches bactériennes. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits et permettraient d'ouvrir d'autres pistes à la recherche. Les extraits ont été solubilisés dans du DMSO. Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par **(Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007 ; Rota *et al*., 2008).**

Afin de mettre en évidence l'effet antibactérien in vitro des différents extraits, nous avons choisi la méthode de diffusion des disques sur milieu de Mueller-Hinton gélosé. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé à effet antibactérien en milieu solide dans une boite de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'activité antibactérienne sur la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition.

- **Mode opératoire**

II.3.2.1 Préparation des dilutions des extraits

Les extraits ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de200 mg/ml.

II.3.2.2 Préparation de l'inoculum

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans bouillon nutritif pour avoir une turbidité voisine à 0,5McFarland, puis portées à l'incubation pendant 18à 24 heures à 37°C.



Figure 23 : Préparation de suspension bactérienne **(originale, 2022**)

II.3.2.3 Préparation des disques

Des disques de papier Wattman n°1 de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 121°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait à tester, des disques imprégnés de DMSO sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.

II.3.2.4 Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boites Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est Frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boite de 60° à chaque fois.

L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boites de Pétriavec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits (10 µl) sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile **(Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007; Rota *et al.*, 2008).**

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenants des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés .Finalement, les boites de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

II.3.2.5Choix des antibiotiques utilisés

Selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie **(Casfm, 2012**), le choix des antibiotiques testés sur les différentes souches bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel contre des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique. La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions au tour des disques.

II.3.2.6 Détermination des CMI et CMB

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), Il s'agit de déterminée la plus petite concentration d'antibiotique donnant une inhibition de la croissance après un temps de contact avec l'antibiotique de 18 à 24 heures **(Briand, 1986).** Des dilutions successives au demi,ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 200 à 0.78 mg/ml en effet de chaque dilution on prélève 10 µl et on la mit sur les disques qui sont déjà dans les boites de pétri. Après détermination de la CMI, pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) un prélèvement à l'anse est réalisé autour de chacun des disques ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé enstrie sur gélose Mueller Hinton. La boîte ensemencée est incubée 24 heures à 37°C. La plus petite concentration qui ne laisse que 0,01% de bactéries survivantes après un temps d'exposition à l'antibiotique de 12 à 18 heures correspond à la CMB **(Briand, 1986)**.



Figure 24 : Préparation de l'activité antimicrobienne **(Originale, 2022).**

II.3.2.7 Lecture des résultats

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques et peut être symbolisée par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de nos échantillons **(Ponce *et al*., 2003).**

· Souche non sensible (-) ou résistante : diamètre≤ à 8 mm ;

· Souche sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm ;

· Souche très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm ;

· Souche extrêmement sensible (+++) : diamètre à ≥ 20 mm ;

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1 Rendement de l'extraction

L'extraction et la préparation des phases aqueux, et des phases alcooliques à partir de l'éthanol et le méthanol du l'écorce du grenade a permet d'obtenir des extraits de différente couleurs, et différente aspects qui sont conservés au réfrigérateur dans des flacons ombrés jusqu' à leur utilisation.

La préparation des extraits à partir d'écorces de la grenade a été effectuée par les solvants suivant : eau, méthanol et éthanol. Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts: l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et l'extrait éthanolique. Exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la poudre d'écorces, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait méthanolique**35.06±0.04%**suivi par l'extrait éthanolique **30.01± 0.03%**et enfin l'extrait aqueux possède le plus faible rendement avec **25,61± 0,5%**. Les extraits obtenus ont la même couleur et le même aspect **(Tableau07) (Figure25)**.

Ces résultats sont presque inferieurs au résultat de **Safi et Banbrahim, (2016).** Par contre, **Douaouri (2017)** enregistré un rendement plus élevée comparativement à notre qui a trouvé un rendement de 71,32%.

Tableau VII : Aspect, couleur et % du rendement des différents extraits d'écorces de la Grenade

Extraits	Aspect	Couleur	Rendement %
aqueux	Pâte collante	Brune	**25,61± 0,5%**
méthanolique	Pâte collante	Brune	**35.06±0.04%**
éthanolique	Pâte collante	Brune	**30.01± 0.03%**

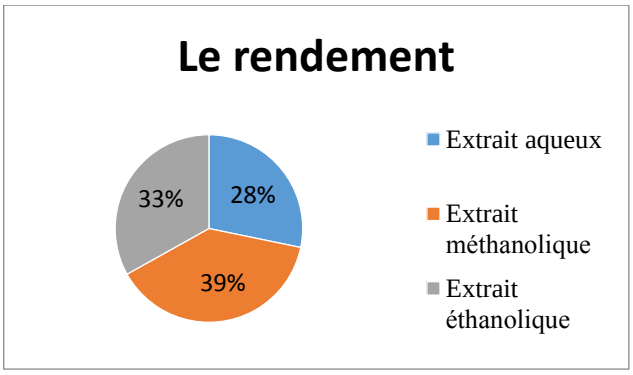


Figure 25: Secteur du rendement

III.2 Etude de l'activité antioxydante des extraits étudiés

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire **(Ozturk *et al.*, 2007).**

Donc, la mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de l'écorce a été réalisée par une technique chimique : Le piégeage du radical libre DPPH.

III.2.1 Piégeage du radical DPPH

Le radical DPPH est généralement l'un des composés le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical et la simplicité de l'analyse **(Bozin*et al.*, 2008).** Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution méthanolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée, d'où l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en acide ascorbique; la méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration.

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits des différents solvants étudiés afin de déterminer l'extrait le plus actif.

D'après les résultats représentés **(figure 26)**, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration des différents extraits de la plante, donc l'activité anti-radicalaire est proportionnelle à la concentration de l'extrait.

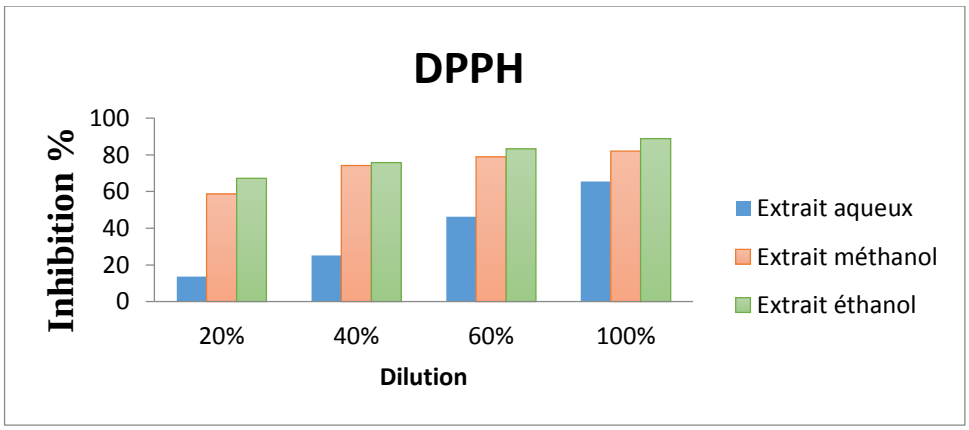


Figure26 : Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH• par les extraits. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

Les résultats montrent que la dilution 60% de l'extrait éthanolique d'écorce inhibe **83,27%** du DPPH et l'extrait méthanolique inhibe **78,9%**, tandis que l'extrait aqueux affiche le plus faible pouvoir inhibiteur avec un pourcentage d'inhibition égale à **46,27%**. Donc, l'extrait éthanolique présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé par rapport à l'extrait méthanolique, ainsi que l'extrait aqueux.

L'analyse des résultats a montré que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est influencé par le type du solvant choisie. Donc l'extrait éthanolique a une activité antioxydante la plus puissante par rapport aux autres extraits.

Negi et Jayaprakasha, (2003) ont rapporté que l'extrait d'écorces de la grenade présent une forte activité antioxydante dans le test de DPPH.

Le résultat obtenu est en accord avec ceux rapportés par **Malviya *et al*. (2014).** En effet, il se situe entre 79,5% et 94,6%, qui représentent la capacité d'inhibition du radical libre(DPPH) de l'extrait méthanolique et hydro-éthanolique respectivement. Cependant, une autre étude de **Zahin *et al*. (2010)** a trouvé des pourcentages d'inhibition de 90,53%, 84,4% et 83,2% pour les fractions de méthanol, d'acétone et d'éthanol respectivement à une concentration de 80µg/ml. Ces résultats sont considérés comme supérieurs à celui de notre échantillon.

La teneur élevée en composés phénoliques contenue dans l'extrait de l'écorce de grenade peut expliquer sa forte activité antioxydante. Dans les investigations sur les activités antioxydantes de certains extrais de peau de fruit y compris la grenade et la banane, la peau de grenade a montré l'activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée **(Okonogi *et al*., 2007).**

Les résultats de test de piégeage du radical libre DPPH suggèrent que les composants qui se trouvent dans l'écorce de la grenade sont capables de piéger les radicaux libres par l'intermédiaire des mécanismes de donation d'électrons ou d'hydrogène et pourrait donc être en mesure d'empêcher l'initiation des réactions en chaine des radicaux libres délétères induites dans les matrices sensibles comme les membranes biologiques. Ceci indique que les composants de l'écorce de grenade peuvent être des agents thérapeutiques utiles pour le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux **(Abdelazin *et al*., 2011).**

III.3 Etude de l'activité antimicrobienne des extraits étudiés

L'évaluation antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, dans le but de tester l'effet de nos échantillons sur quatre souches bactériennes à une concertation de 0,15 g/ml pour l'extrait de l'écorce. **(Figure 27).**



Figure 27 : préparation de test antimicrobien sur l'EG**(originale, 2022)**

Les résultats de l'essai sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau VIII : Souche A : *Pseudomonas aeroginosa*

Les extraits	Les répétitions	Diamètre d'inhibitions par (mm)	
Méthanolique	20% 40% 60%	15 2020 25	**Extrêmement sensible (+++)**
Ethanolique	20% 40% 60%	21 25 25 — 23.66	
Aqueux	20% 40% 60%	23 30 30 — 27.66	

Tableau IX : Souche B : *Bacillus cereus*

Les extraits	Les répétitions	Diamètre d'inhibitions par (mm)	
Méthanolique	20% 40% 60%	09 12 → 11 12	**Sensible (+)**
Ethanolique	20% 40% 60%	08 10 → 10 12	
Aqueux	20% 40% 60%	09 09 → 9 .66 11	

Tableau X : Souche C : *Escherichia coli.*

Les extraits	Les répétitions	Diamètre d'inhibitions par (mm)	
Méthanolique	20% 40% 60%	14 1415 17	**Très sensible(++)**
Ethanolique	20% 40% 60%	13 1414.67 17	
Aqueux	20% 40% 60%	14 14 → 15 16	

Tableau XI : Souche D :*Staphylococcus aureus.*

Les extraits	Les répétitions	Diamètre d'inhibitions par (mm)	
Méthane	20% 40% 60%	13 15 15 — 14 .33	**Très sensible (++)**
Ethane	20% 40% 60%	15 20 20 — 18.33	
Aqueux	20% 40% 60%	15 15 23 — 17.66	

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenue in vitro à l'aide de la méthode diffusion sur gélose montrent que l'activité antibactérienne de l'extrait de grenade varie en fonction des bactéries testées et le solvant utilisé.

Les résultats montrent que l'extrait de grenade possède une activité antibactérienne remarquable sur toutes les souches étudiées. En effet, l'activité la plus intense a été enregistrée pour ***Pseudomonas aeroginosa*** avec un diamètre d'inhibition de **20mm**pour l'extrait méthanolique et de diamètre **23.66 mm** pour l'extrait éthanolique et de diamètre **27.66mm**pour l'extrait aqueux, suivie par ***S. aureus*** avec un diamètre d'inhibition de **14.33mm** pour l'extrait méthanolique et de diametre**18.33mm** pour l'extrait éthanolique avec un diamètre de **17.66mm** pour l'extrait aqueux. Suivie par ***Escherichia coli*** avec un diamètre de **15mm** pour l'extrait méthanolique et de diamètre**14.67mm** pour l'extrait éthanolique et de **15mm** pour l'extrait aqueux. Enfin, l'activité la plus faible a été enregistrée pour ***Bacillus cereus*** avec un diamètre d'inhibition de **11mm** pour l'extrait méthanolique et de **10mm** pour l'éthane avec un diamètre de **9.66** pour l'extrait aqueux **(Figure25).**

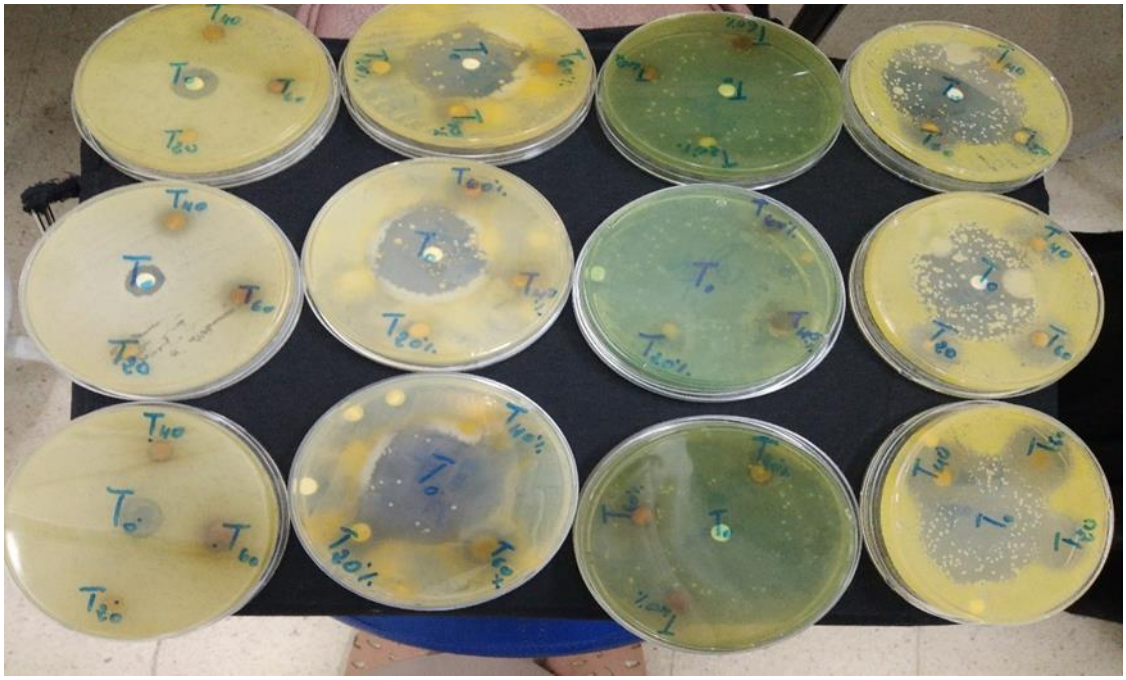


Figure 28 : Résultats des tests antibactériens de l'EG vis-à-vis des bactéries

*E. coli, S. aureus, Pseudomonas aeroginosa***,** *Bacillus cereus. (***Originale, 2022)**

D'après les résultats obtenus, il apparait que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'écorce.

Les souches *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* montrent les mêmes zones d'inhibition dont les diamètres sont entre (**13_27mm**) avec une zone d'inhibition de diamètre plus remarquable pour *Pseudomonas aeroginosa* **(figure29).**

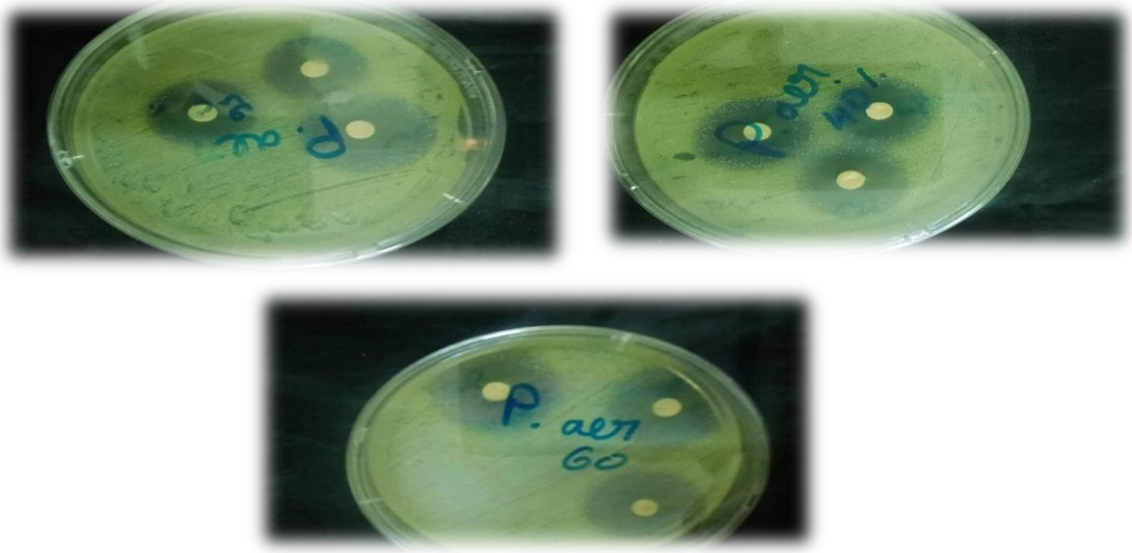


Figure 29 : Résultat de test antimicrobien (*Pseudomonas aeroginosa*) sur l'EG **(Originale, 2022)**

D'après les résultats obtenus, il apparait que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'écorce. A partir des résultats exprimés dans les tableaux précédents, ces résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'écorce ont été exprimés comme diamètre de zones d'inhibition des différentes souches bactériennes.

Nos résultats sont similaire que les résultats de **Reguieg et Hammadi**, **(2017)**qui ont trouvé que tous les extraits de grenade (extrait aqueux, éthanolique et méthanolique),montrent une activité antibactérienne élevée sur *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les résultats de l'activité antibactérienne de ces extraits sur les souches *Pseudomonas et Escherichia coli* corroborent nos résultats. Pour la même étude, la zone d'inhibition trouvée pour la souche *Staphylococcus aureus* est plus élevée que nos résultats est plus élevées pour la souche *Pseudomonas aeroginosa.*

La sensibilité des souches Gram- (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*) est due à la présence d'une fine couche de peptidoglycane perméable aux alcools y compris l'éthanol présent dans notre extrait. Cependant pour les Gram+ *(Bacillus cereus)* la présence d'une paroi épaisse de peptidoglycane empêche la pénétration de substances antibactériennes solubilisées dans l'éthanol. L'hypersensibilité de la souche Staphylococcus aureus peut s' expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries

Gram+ aux changements environnementaux externes tels que la température, le pH et les extraits naturels, dû à l'absence de la membrane externe **(Balentine *et al*. , 2006).**

Braga *et al*. (2005) ont observé que les extraits méthanolique de grenade pouvaient inhiber non seulement la croissance de *S. aureus* mais également la production de l'entérotoxine.

Conclusion

&

Perspectives

Les plantes médicinales continuent toujours d'être la provenance idéale des principes actifs, ce qui explique leur exploitation accrue en industrie pharmaceutique. Les polyphénols sont les composés végétaux les plus intéressants et les plus étudiés de nos jours.

L'évaluation des plantes médicinales pour leurs activités biologiques a augmenté considérablement en Algérie. Ceci montre que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont certainement intéressantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances.

Dans le cadre de notre travail, différents aspects d'écorces de la grenade ont été étudiés. Nous sommes intéressées à l'estimation du potentiel antioxydant, antibactérien des extraits bruts de l'écorce de grenade (***Punica granatum***).

Dans le premier volet de ce travail, on a commencé par la détermination des rendements qui différents extraits en fonction des solvants utilisés : le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait méthanolique 35.06±0.04% suivi par l'extrait éthanolique 30.01± 0.03% et enfin l'extrait aqueux qui possède le plus faible rendement avec 25,61±0,5%.

Dans le deuxième volet, l'activité antioxydante des différents extraits d'écorces de la grenade a été évaluée par la méthode de réduction du radical libre DPPH. L'extrait éthanolique d'écorce montre la plus forte activité de piégeage contre les radicaux DPPH suivis par l'extrait méthanolique tandis que l'extrait aqueux affiche le plus faible pouvoir inhibiteur.

Dans le dernier volet, l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'écorce a été réalisée sur quatre souches bactériennes (2 Gram+ et 2 Gram-) *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus.* Cependant, l'extrait de l'écorce a montré un effet assez important sur *Pseudomonas, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibitions allant de 14 à 27mm, par contre il a montré un effet moins important sur *Bacillus cereus* avec une zone d'inhibition 9mm.

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 les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de ce fruit. L'ensemble de ces résultats obtenus in

vitro ne constituant 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.

Références Bibliographiques

A

Abdelazim Negm et al. 2011. Overview of Remote Sensing and its Applications and was the head of the Environmental Engineering.

Adjadj M. (2009). *Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydasedes extraits de la plante médicinale Ajuga iva L. Schreber. Thèse de Magistère en biologiecellulaire et moléculaire de l'université Mentouri Constantine, 96P.*

AFAQ F., SALEEM M., KRUEGER C.G., REED J.D. et MUKHTAR H. (2005).Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK andNF-Kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International JournalCancer*, 113, 423-433.

Ahmed S., Wang N., Hafeez B. B., Cheruvu V. K. et Haqqi T. M. (**2005).** *Punicagranatum* L. extract inhib-its IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinasesby inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes invitro. *J of Nutrition*, 135: 2096–2102.

Ajaikumar K. B., Asheef M., Babu B. H., Padikkala J. (2005). The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J of Ethnopharmacology*, 96: 171–176.

Alía M., Ramos S., Mateos R., Granado-Serrano A. B., Bravo L. & Goya L. (2006). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. Toxicol. Appl. Pharmacol212, 110-118.

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.

Amouretti M.C., Comet .G.1992- Cahier d'histoire des techniques - Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'université de Provence. 1992. 174 pages.

Aruoma O. I. & Halliwell B. 1998. Molecular Biology of free radicals in Human Diseases. Londres, OICA International.assessment of essential and othertrace elements in 14 fruits harvested and consumed in Pakistan.atherosclerotic apolipoprotein deficient mice. Am J Clin Nutr, 71: 1062–76

Azzouz M A. et Bullerman L B. 1982. Comparative antimycotic effects of selected.

B

Basaran Dulger and Ahmet Gonuz , 2004. Antimicrobial Activity of Certain Plants used in Turkish Traditional Medicine. Asian Journal of Plant Sciences.behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol. Dis, 24, 3: 506–515

Berche P, Gaillard J-L, Simonet M (1989) Bactériologie : bactéries des infections humaines.Médecine-Sciences Flammarion.

Berger M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition clinique et métabolisme 20, 48-53.

Biesalski H. K., Böhles H., Esterbauer H., Fürst P., Gey F. & Hundsdörefer G. (**1997)**.Antioxidant vitamins in prevention. Consensus statement. Clin. Nutr.16, 1515.

Blois, M.S. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, 181, 1199-1200.

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

Bonnet S. (2010). Variability of sea-surface temperature and sea-ice cover in the Fram Strait over the last two millennia. Marine Micropaleontology74 (3-4), 59-74.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I. Et Igic R. (2008). Phenolic as antioxidant in garlic (Allium sativum L., Alliaceae). Food Chemistry, 111(4),925-929.

Boullard B.2001.Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Editions Estem. 636 pages. Pages 437-438.

BRAGA L.C., SHUPP J.W., CUMMINGS C., JETT M., TAKAHASHI J.A., CARMO L.S., CHARTONE-SOUZA E et NASCIMENTO A.M. (2005). PomegranateextractinhibitsStaphylococcus aureus growth and subsequent enterotoxinproduction.JournalEthnopharmacol, 96, 335-339.

Brouillard, R., 1986. The flavonoids Advances. In : research since 1993. Harborne J B, Chapman and Hall, London. 525538 p.

Bruneton J. (1999). Acides phénols. In : Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. Pp 198-260.

Brzozowska J., Hanower P., 1976. Recherches sur les composes phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. Annales de l'université d'Abijan, série C (Science), tome XII : 65 - 80.Bulletin, 29: 1258–by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes .

C

Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., FrelonCASFM. (2012) European Manual of Clinical Micro biology. Vol 1st edition, Vivactis Plus. 33. Garnacho Montero.cellulaire et moléculaire de l'université Mentouri Constantine, 96P.

Chatgilialoglu C. & Asmus K. D. (1990). Sulfur-centred reactive intermediates in chemistry and biology. NATO-ASI series197, 12-16.chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids.Communication scientifique, Conseil de la recherche industrielle et scientifique, Newcomposition and processing. Journal Agricultural Food Chemistry, 48(10):4581-4589.Composition of Citrus Pell and Seed Extracts. J. Agric. Food Chem, 46(6): 212323.

COWAN M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical MicrobiologyReviews*,12, 564-582.

D

Dworkin,M., Falkow,S., Rosenberg,E., Schkeufer, KH., Stackebrandt,E. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd. ;Springer, New-York,2006.Vol4, Chap.1.2.1. The genera Staphylococcus and Macrococcus, p4-75.

DALIMOV D.N., DALIMOVA G.N. et BHATT M. (2003). Chemical compositionand lignins of tomato and pomegranate seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 37-40.

Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A. (2002). Regulation of gene expression by reactive oxygen, Signalling, 14, p. 879.

Dean, F.M., (1963). Naturall occuring Oxygen Ring Compounds. Butterworths. Londres. P 148.Delhi des extraits de la plante médicinale Ajuga iva L. Schreber. Thèse de Magistère en biologiedes produits industriels, les matières premières. Tome VII .

Douaouri Nor El Houda, (2017) ; Contribution à une étude phytothérapeutique,

Duval J. ; Soussy C.Y. (1985). Abrégé Antibiothérapie. 3ème édition Masson M, Paris. P180.Récentes. Faculté de pharmacie, université HenripoincareNancy1**.**

E

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

Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M. 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant métabolites. Phytochemistry ; 68: 939-953.

F

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

Farombi E. O., Adelowo O. A. & Ajimoko Y. R. (2007). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African Cat Fish (Clarias gariepinus) from Nigeria Ogun River. International Journal of Environmental Research and Public Health4(2), 158-165.

Fattorusso W. ; Ritter. O. (2001). Vadémécum cliniques, Du diagnostic au traitement. 16ème édition Masson m, Italie. P 1915.

Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique13, 108-115.

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

Favier. A. 2006. Le stress oxydant, et pathologies humaines. Ann Pharm Fr.Flavonoids in biology and Medecine II; Biochemical. Cellular and Medicinal properties. New York.

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.flore française ; in : « Le grenadier (*Punica granatum*): plante historique et évolutions Food chemistry, 115 (3), 873-877.

g

Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A., Rostagno MA. & Martinez J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implication in cancer and cardiovascular disease. Inflammation Research58, 537-552.

GARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L., *et al*. (1961). Ressources médicinales de laflore française ; **in** : « Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ». Thèse pour obtenir le grade de Docteur enpharmacie. Nancy: université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 pages.

Gil Mi., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M, Kader grade de Docteur en pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 *Pgranatum* L. extract inhib its IL-1beta-induced expression of matrix metallo proteinases granatum) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ».

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

GUILLAUME G., MACH-CHIEU. (1987). Pharmacopée et médecine traditionnelle chinoise

- Plantes chinoises, plantes occidentales ; **in** : « Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ». Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 pages.

Gutteridge J. M. C. (1993).Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. Invited review. Free Radic. Res. Commun 19, 141-158.

H

Haidari et al. **(2009).** Pomegranate (*Punica granatum)* purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir, University ofTexas Health Science Center at Houston, USA.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C. & Chapelle J. P. (2007). Le stress oxydant. Rev Med Liege62, 628-638.

Halliwell B. & Gutteridge J. M. C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Edition. Oxford Science Publication, p: 69-103.

Halliwell B. & Gutteridge J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, p: 56-98

Halliwell B., & Gutteridge J. M. C., (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem. Biophys280, 1-8.

Hamza T (1993). Introduction à la biologie moderne. Berti Editions.

Hanaski Y., Ogawa S. & Fukui S. (1994). The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Radic. Biol. Med.16, 845-850.

Handa, S., Khanuja, S.P., Longo, G. and Rakesh, D.D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial.

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

Hartman R. E. (2006). Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis,* 24, 3: 506–515.

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

G

Jahfar M., Vijayan Kk. Et Azadi P. (2003). Studies on a polysaccharide from the fruit apan, 38, 141-148).Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 260: 523-531.

Jung Bettina. et Curtay Jean-Paul . (2010). La grenade, aliment-plus. Ed .*marco pietteur* , P : 09- 10.

Jung K.H. et al. **(2006).** Suppressive effect of *Punica granatum* on the production oftumor necrosis factor (Tnf) in BV2 microglial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 1258–1261.

H

Kaur G., Jabbar Z., Athar M.et Alam M. S. (2006). *Punica granatum* L.keratinocytes. Photochemistry and Photobiology, 81, 38-45.

L

LANSKY E.P et NEWMAN R.A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal Ethnopharmacol*,109(2),177-206.

LAROSSA M., GONZALEZ-SARRIAS A., YANEZ-GASCON M.J., SELMA M.V.,AZORIN-ORTUNO M., TOTI S., TOMAS-BARBERAN F., DOLARA P. et ESPIN J.C.(2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and itsmetabolite urolithin-Ain a colitis rat model and the effect of colon inflammation onphenolicmetabolism.*Journal Nutrition Biochemistry*, 21 (8): 717-725.

Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M (1995). Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.

LEE CJ, CHEN LG, LIANG WL, WANGA CC. (2010). Anti-inflammatory effectsof*punica granatum* linne *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, 118: 315-322.

Leverve X. (2009). Stress oxydant et antioxydants. Cahiers de Nutrition et de Diététique44 (5), 219-224.lignins of tomato and pomegranate seeds. Chemistry of Natural Compounds, 39, 37-40 .

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

M

MAATAOUI B.S., HMYENE A. et HILALI S. (2006). Activités anti-radicalaires d'extraitsde jus de fruits du figuier de Barbarie (O*puntia ficus indica). Lebanese ScienceJournal7:3-8.*

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. [Eds] 1997. Biology of Microorganisms, 8th ed. Prentice Hall Upper Saddle River Press, London, 986 pp.

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

Malviya S., Alok Jha A. Et Hettiarachchy N. (2014). Antioxidant and Antibacterial Potential of Pomegranate Peel Extracts. Journal Food Science Technology, 51(12), 4132–4137.

Marc T.; Gerard W. ; Denis L (2001). Classification des anti-inflammatoires in Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4ème Edition. P 426.

MedicSanic, M., Jasprica, I., SmolcicBubalo, A., Mornar, A., 2004. Optimization

Morelle, J., et Israel, L. (2003). L'oxydation des aliments et la santé. Edition Impression Natural Products, 67: 2096-2098. of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate.oilsphytotherapy research. 18 : 435448.

N

Negi, P.S., Jayaprakash, G.K., Jena, B.S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chemistry 80, 393-397.

O

OZCAL N et DINC S. (1993). Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum L.*) peelsfrom the standpoint of pharmacy. *Eczacılık Fakultesi Dergisi*, 22, 21-29.

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.

Ozturk M., Aydogmus-Ozturk F., Duru M. E. & Topcu G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (Rheum ribes): An edible medicinal plant. Food Chem. 103, 623-630.

P

Parekh, J. and Chanda, S. (2007) In Vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. Turkish Journal of Biology, 31. Patent

PAUL DK et SHAHA P.K. (2004). Nutrients, vitamins, mineral content in common citrus pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 pages.Phenolic Extracts of the Pomegranate (Punica granatum). American Journal of Microbiology.

Pichard E. ; Beytout J. ; Delmon J. ; Marchou B. (2002) Malintrop afrique (Manuel de Maladie infectieuse pour l'Afrique, Edition John Libbey Eurobest 127, Montrouge. P 589.

Planchon et Collin, 1875) Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine Poincaré - Nancy 1 : P26 et 132-133.Pomegranate fruit extract modulates UV-Bmediated phosphorylation of mitogen-activated

PONCE A.G., FRITZ R., ROURA S.I. et DEL VALLE C.E. (2003). Antimicrobial activityof essential oils on native microbial population of organic swisschard. *Food Scienceand Technology*, 36(7), 679-684.

Psotova, J., Lasovsky, J., Vicar, J., 2003. Metal chelating properties. Electrochemical behavior. Scavenging and cytoprotective activities of sixnaturalphenolic. Biomed. 174153 p. Purification Technology, 54, 4450.*Punica granatum*L in vitro and in vivo. Food Chemistry, 118: 315-322.

R

Ram, A. (**1998)** La richesse de l'Inde, dictionnaire des matières premières indiennes etdes produits industriels, les matières premières. Tome VIII: Institut nationaldelacommunication scientifique, Conseil de la recherche industrielle et scientifique,NewDelhi.

Ribereau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux, Ed :Dunnod. 10-26.

S

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

Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1990. Nutritional consequences of dietary tannins : consequences and remedies. Boca Raton. Florida : CRC press. Pp 113146.

Singht SB, Barrett JF (2006). Empirical antibacterial drug discoveryfoundation in naturalspecificity of DNA repair glycosylases, Biol. Chem., 2002, 383(6), p. 93.

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

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

J

TEZCAN F., GULTEKIN-OZGUVEN M., DIKEN T. et ERIM FB. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranatejuices. *Food chemistry*, 115 (3), 873-877.

TOMAS-BARBERAN F.A. (2010). Grenade et santé : aspects pharmacologiques

TSUYUKI H., ITOH S. et NAKATSUKASA Y. (1981). Studies on the lipids in pomegranate tumor necrosis factor (Tnf) in BV2 microglial cells. Biological and Pharmaceutical

TZULKER R., GLAZER I., BAR-ILAN I., HOLLAND D., AVIRAM M. et AMIRR.(2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds indifferentfruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions.*Journal Agricultural Food Chemistry*, 55, 9559-9570.

W

WAHEED S, SIDDIQUE N, RAHMAN A, ZAIDI JH, AHMAD S. (2004). INAAfor dietary assessment of essential and othertrace elements in 14 fruits harvested and consumedinPakistan. *Journal of Radio analytical and Nuclear Chemistry*, 260: 523-531.

WALD E. (2009). Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy1:université HENRI POINCARE-Nancy 1, 158 pages.

Y

Yildirim N. C., Benzer F. & Danabas D. (2011). Evaluation of environmental pollution at Munzur river of Tunceli applying oxidative stress biomarkers in Cappota trutta (Heckel, 1843). J. Anm. Plant Sci.21 (1), 66-71.

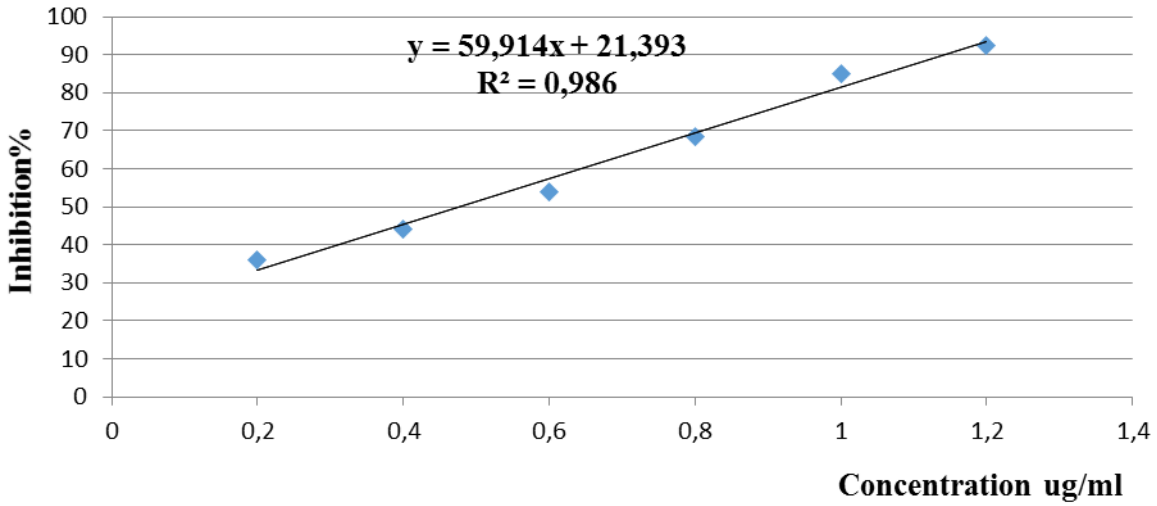
Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y. 2004 Free radicals in chemistry, Biology(2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compound in different fruit juices (2010).

Z

ZAHIN M., AQIL F. et AHMAD I. (2010). Broad spectrum antimutagenicactivity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. 703(2), 99-107.

Annexes

Annexes 01 : Courbes du test au DPPH (courbe de l'acide gallique)



Annexes 02 : Courbes du test au DPPH (courbe de l'acide ascorbique)

