N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master académique
En : Sciences de la nature et de la vie
Spécialité : Microbiologie appliquée
Par :

BELHADJ Kenza

CHOUIT Zohra

SUJET :

Détermination du pouvoir antibactérien *in vitro* des huiles essentielles de pelle de grenade *Punica granatum*, et leur application thérapeutique.

Soutenu publiquement le 20/ 06/ 2018, devant le jury composé de :

M^me^ Douaoui S	M A A	A l'U.Y.F.M	Président.
M^me^ Boukhelfoun L	M A A	A l'U.Y.F.M	Examinateur.
M^me^ Salem S	M A B	A l'U.Y.F.M	Examinateur.
M^r^ Chami B	M A A	A l'U.Y.F.M	Promoteur

Année universitaire : 2017-2018

Résumé

Résumé :

Cette étude consiste à évaluer l'efficacité antimicrobienne des HEs obtenues à partir d'une plante médicinale *Punica granatum maxima rubra* jugées par la médicine traditionnelle avoir un grand effet anti-infectieux. Ceci afin de rationaliser leur usage pour les appliquer comme remède alternatif aux antibiotiques face à l'émergence de multi-résistance bactérienne et à l'échec de l'antibiothérapie. Les huiles essentielles de cette plante ont été testées sur deux souches microbiennes pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques: souche bactérienne Gram (-) (*Escherichia coli*), et une souche bactérienne Gram (+) (*Staphylococcus aureus*).

Des propriétés antibactériennes intéressantes des HE étudiées ont été constatées sur les germes testées. Les résultats obtenus ont mis en évidence des zones d'inhibition de diamètres dépassant 20 mm, pour les deux souches et concernant les huiles étudiées, suggérant une forte sensibilité des bactéries aux agents testés. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les deux souches *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli.* Cette activité antibactérienne sur des bactéries Gram (+) et Gram (–) multi-résistantes aux antibiotiques, peut contribuer à la lutte contre les maladies infectieuses et offrira éventuellement la possibilité d'utilisation de ces HEs en industrie phyto-thérapeutique.

Mot clés : huiles essentielles ; antibiotique ; *Escherichia coli ; Staphylococcus aureus.*

Abstract :

This study consists of evaluating the antibacterial efficacy of EOs obtained from a medicinal plant *Punica grantum maxima rubra* judged by traditional medicine to have a great anti-infective effect. This is to rationalize their use to apply them as an alternative antibiotic remedy to the emergence of multi-bacterial resistance and the failure of antibiotic therapy. The essential oils of this plant were tested on two pathogenic microbial strains multi-resistant to antibiotics: Gram (-) bacterial strains (*Escherichia coli*) and a Gram (+) bacterial strain (*Staphylococcu*

Interesting antibacterial properties of the EOs studied were observed on the tested germs. The results obtained showed zones of inhibition of diameter exceeding 20 mm, for both strains and concerning the oils studied, suggesting a high sensitivity of the bacteria to agents tested. No statistically significant difference was observed between the two strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli.*

This antibacterial activity on Gram (+) and Gram (-) multi-antibiotic resistant bacteria can contribute to the fight against infectious diseases and will eventually offer the possibility of using these EOs in phytotherapeutic industry.

Key words: essential oils; antibiotic; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

ملخص :

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم فعالية مضادات الميكروبات للزيوت الأساسية التي تم الحصول عليها من نبتة الرمان الطبية و قد تم العثور عليها من قبل الطب التقليدي و التي تملك تأثير كبير في مكافحة الأمراض المعدية. و هذا من أجل استخدامها كعلاج بديل للمضادات الحيوية لمواجهة البكتيريا متعددة المقاومة و فشل العلاج بالمضادات الحيوية. تم اختبار الزيوت الأساسية لهذا النبات على سلالتين من البكتيريا المسببة للأمراض و المقاومة للمضادات الحيوية الإشريكية القولونية (سالبة الغرام) و المكورات العنقودية الذهبية (موجبة الغرام). وجدت خصائص مضادة للميكروبات للزيوت الأساسية مثيرة للاهتمام و ذلك من خلال اختبارها على البكتيريا. أظهرت النتائج المتحصل عليها للزيوت التي تمت دراستها أقطار التثبيط تزيد عن 20مم لكل من السلالتين مما يدل على حساسية البكتيريا العالية للزيوت المستخدمة. لم يلاحظ أي فرق معتمد به إحصائيا بين سلالتي المكورات العنقودية الذهبية و الإشريكية القولونية. هذا النشاط المضاد للبكتيريا موجبة الغرام و سالبة الغرام متعددة المقاومة للمضادات الحيوية يمكن أن يساهم في مكافحة الأمراض المعدية و ربما سيوفر إمكانية استخدام هذه الزيوت الأساسية في ميدان الطب البديل.

الكلمات المفتاحية: زيوت عطرية **المضادات** الحيوية.؛ **المكورات** العنقودية الذهبية; الإشريكية القولونية.

Remerciement

Remerciement

Avant toute chose, je tiens â remercier mon Dieu qui m'a donné la force et la patience.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Mr. Chami pour sa confiance, son soutien, son attention, ses bons conseils, ses qualités humaines. Pour tout cela, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude. Pour ces encouragements et surtout pour la grande patience qu'il a manifestée, je me trouve incapable de formuler mes remerciements à lui. Aujourd'hui je témoigne que je vous suis redevable et je vous remercie par l'occasion, pour avoir bien voulu examiner mon travail.

Je remercie les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, je vous en Suis très reconnaissante et en espérant être à l'hauteur de votre confiance.

Mes sincères remerciements à Mme Douaoui pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de mon soutenance.

Je remercie également Mme Salem pour l'honneur qu'il m'a réservé d'avoir accepter d'examiner ce travail.

Je remercie également Mme Boukhelfoun pour l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant d'examiner ce travail.



Je dédie ce mémoire

À mon cher père Abd el Kader et ma très chère mère Fatima qui mon aidé par leur amour et leur encouragement à réaliser mon travail qu'ALLAH vous protège et ne me prive jamais de vous.

À mon frère Ahmed et sa femme Siham et leurs enfants : Ayham et Wassim.

À mes frères : Saïd, Kamel, Nassim et Aymen, qui m'ont toujours encouragé et soutenu. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma grande gratitude.

À ma très chère sœur Ghania qui mon aidé par son soutien, son attention, ses bons conseils.

À ma sœur Djamila et son mari : Mohamed et leurs enfants : Khadîdja et Youcef.

Á mon amie l'intime : Nour el houda.

Á mes cousins et cousines.

Á mon binôme Zahra.

Á toutes les familles Belhadj et Belarbi.

Á toute la promotion microbiologie appllíquée 2017/2018





Kenza

Dédicace

Je dedie ce modest travail et ma profonde gratitude à les plus etres au monde mon chèr grand pére qui est toujour a coté de moi et ce lui qui ma toujours encourager et qui attendre le fruit de mes études

Je le dédie

Les deux prunelles de mes yeux mes adorables mon père et ma mère

Mes grands parents et je profite l'occasion de leurs dire que je vous aime trés fort

A mes sœurs Amel Romaissa Loubna et Hadjer

A mes oncles et mes tantes

A mes cousins et cousines

A toutes les familles CHOUIT et BESSEM

Et à tous mes amis surtout. Mon binôme Kenza

A mon collègue Metidji Abdelkader

A Akila, fatima ,hayat fayza bouchra fadhila

A toute la promotion microbiologie appliquée

2017/2018

Zohra

Sommaire

Sommaire

Introduction

Synthèse bibliographique

I. La grenade.....3

I.1. Historique.....3

I.2. Description de la grenade.....3

I.2.1. Origine.....3

I.2.2. Production mondiale.....3

I.2.3. Production en Algérie.....3

I.2.4. Le fruit.....4

I.2.5. Intérêt thérapeutique.....5

I.2.6. Classification.....5

I.3. Composition des différentes fractions du fruit.....6

I.3.1. Les composés phénoliques.....7

I.3.2. Classification des phénols.....8

I.3.2.1. Phénols simples.....8

I.3.2.1.1. Acides phénoliques.....8

I.3.2.1.2. Les flavonoïdes.....8

I.3.2.2. Les polyphénols des huiles essentielles de la grenade.....8

1.3.3. Potentiel santé des extraits de la grenade.....9

1.3.3.1. Activités thérapeutiques de la grenade.....9

1.3.3.1.1. Activité antioxydant.....10

1.3.3.1.2. Activité anti-inflammatoire.....10

1.3.3.1.3. Activité anticarcinogénique.....10

1.3.3.1.4. Activité antidiabétique.....11

1.3.3.2. Autres effets de la grenade sur la santé.....11

1.3.3.2.1. Problème Cardiovasculaire.....11

1.3.3.2.2. Problème de l'Estomac.....11

1.3.3.2.3. Problème dentaire.....11

1.3.3.2.4. Trouble d'Alzheimer.....11

1.3.3.3. Applications industrielles de la grenade 11

1.3.3.3.1. Industrie alimentaire.....11

1.3.3.3..2. Industrie cosmétique.....12

1.3.3.4. Autres usages.....11

II. Les huiles essentielles.....12

II.1. Définition et caractéristiques des huiles essentielles.....12

II.2. Les activités antibactériennes des huiles essentielles.....13

II.3. Méthodes d'extraction.....14

II.3.1. Extraction par Hydro-distillation.....14

II.3.2. Extraction par solvant.....14

II.3.3. Extraction par Soxhlet.....15

II.3.4. Extraction par ultrason.....15

II.3.5. Extraction par Fluide Supercritique.....15

III. Les bactéries pathogènes dans le tube digestif.....15

III.1. La flore intestinale et maladies du tube digestif.....15

III.2. *Escherichia coli* commensale et pathogène.....16

III.2.1. l'espèce *E. coli*.....16

III.2.2. Notion d'habitat primaire et d'habitat secondaire.....17

III.2.2.1. Habitat primaire.....17

III.2.2.2. Habitat secondaire.....17

III.2.3. *E. coli* pathogène.....18

III.3. *Staphylococcus aureus*.....19

III.3.1. Morphologie.....19

III.3.2. Caractères culturaux.....19

III.3.3. Caractères physiologiques et biochimiques.....20

III.3.4. Pouvoir pathogène de *S. aureus*.....21

IV. Les antibiotiques.....23

IV.1. Histoire de l'antibiothérapie.....23

IV.2. Définition.....24

IV.3. La résistance aux antibiotiques.....25

IV.3.1. La résistance naturelle.....25

IV.3.2. La résistance acquise.....25

IV.4. Les mécanismes de résistance.....26

IV.5. L'antibiogramme.....27

IV.5.1. Définition.....27

IV.5.2. Le but de l'antibiogramme.....27

IV.5.3. Principe.....27

IV.6. Les techniques d'antibiogramme.....28

IV.6.1. Techniques classiques.....28

IV.6.1.1. Méthodes de dilution.....28

IV.6.1.2. En milieu liquide.....28

IV.6.2. Concentration minimale ihnibitrice (CMI).....28

IV.6.3. Méthodes de diffusion (Antibiogramme standard).....29

IV.6.3.1. La bactérie est sensible.....29

IV.6.3.2. La bactérie est résistante.....29

IV.6.3.3. La bactérie est intermédiaire.....30

IV.7. Les effets indésirables des antibiotiques.....30

IV.7.1. Les réactions allergiques.....30

IV.7.2. Les troubles digestifs.....30

Etude expérimentale

V. Matériel et méthode

V.1. Matériel

V.1.1. Matériel végétal (cultivar de grenade) 31

V.1.2. Les micro-organismes.....32

V.1.2.1. Vérification de la pureté des souches.....32

V.1.2.2. Identification des souches utilisées.....32

V.1.2.2.1. Examen macroscopiques.....33

V.1.2.2.2. Examen microscopique.....33

V.1.2.2.3. Test de catalase.....34

V.1.3. Les milieux de cultures et les réactifs utilisés.....34

V.2. Méthodes

V.2.1. Méthode appliquée à la matière végétale.....35

V.2.1.1. Méthode d'extraction des huiles essentielles par hydro-distillation.....35

V.2.1.1.1. Principe.....35

V.2.1.1.2. Préparation de la poudre végétale.....35

V.2.1.1.3. Macération.....36

V.2.1.1.4. Distillation.....36

V.2.1.1.5. Purification.....36

V.2.1.1.6. Conservation.....37

V.2.1.2. Examens appliqués aux germes.....37

V.2.1.2.1. Test de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....37
V.2.1.2.1.1.But.....37

V.2.2. Paramètres de l'activité antimicrobienne des HE.....37

V.2.2.1. Détermination de Ii (L'indice d'inhibition).....38

V.2.2.1.1. Dilution.....38

V.2.2.1.2. Préparation de la suspension bactérienne.....39

V.2.2.1.3. Application de la technique des disques.....39

V.2.3. Antibiogramme.....40

V.2.3.1. Préparation de la dilution des antibiotiques.....40

V.2.3.2. Application des disque.....41

V.2.3.3.incubation.....43

V.2.3.4.Lecture.....43

V.2.4. Traitement statistique des données ……43

VI. Résultat et discussion

VI.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne des (HE).....45

VI.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des antibiotiques (ATB).....48

VI.2.1.Test du traitement de Pénicilline.....49

VI.2.2.Test du traitement de Tétracycline.....51

VI.2.3.Test du traitement de Sulfamide.....53

VI.3. Effet antibactérien des différents traitements.....54

VI.3.1. Effet des deux traitements HE et ATB sur *S. aureus*.....54

VI.3.2. Effet des deux traitements HE et ATB sur *E. coli*..... 56

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques.

Annexes

Listes des figures

Liste des figures :

Partie	Page
I. La grenade	
Figure 1 : Planche anatomique de la grenade, définition des différentes parties du fruit	**4**
Figure 2 : Principaux constituants des différentes parties de la grenade ou de leur extrait	**7**
II. Les huiles essentielles	
Figure 3 : Montage d'Hydro-distillation	**14**
III. Les bactéries pathogènes dans le tube digestif	
Figure 4 : *Escherichia coli*	**17**
Figure 5 : Cycle de vie d'*E. coli*	**18**
Figure 6 : Aspect de S. aureus en microscopie électronique (X 20000)	**19**
Figure 7 : Processus de diffusion de *S. aureus*.	**21**
Figure 8 : Image obtenue par microscopie, image confocale d'un biofilm formé par *Staphylococcus spp*. à la surface d'un cathéter veineux	**22**
IV. Les antibiotiques	
Figure 9 : Différents modes d'action des antibiotiques	**24**
Figure 10 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries.	**26**
Figure 11 : L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance	**27**
Figure 12 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide	**28**
Figure 13 : Illustration d'un antibiogramme standard	**29**
V. Matériel et méthodes	
Figure 14 : La variété du *punica granatum* maxima rubra, a : Arbre en	**31**
période de floraison, b : Fruit de *P. granatum.*	
Figure 15 : Observation macroscopique des colonies, **a** : *S. aureus* dans un milieu Baird-Parker (culture jeune < 24heures), **b** : *E. coli* dans un milieu	**33**

VRBL (culture jeune < 24 heures).	
Figure 16 : Observation microscopique des souches de *S. aureus* et *E. coli* (état frais), **a** : Cellules bactériennes de *S. aureus*, **b** : Cellules bactériennes de *E. coli*.	**34**
Figure 17 : Montage d'extraction par hydro-distillation.	**35**
Figure 18 : Les pelles de grenade séchées.	**36**
Figure 19 : Les pelles de grenade broyées puis émergés dans de l'eau distillée.	**36**
Figure 20 : L'huile essentielle de pelle de grenade après purification.	**37**
Figure 21 : Les dilutions des huiles essentielles de pelle de grenade.	**38**
Figure 22 : La suspension bactérienne de deux bactéries, a : La suspension bactérienne de la bactérie *S. aureus*, b : La suspension bactérienne de la bactérie *E. coli*.	**39**
Figure 23 : Antibiogramme sur les deux bactéries, a : Antibiogramme sur la bactérie *S. aureus*, b : Antibiogramme sur la bactérie *E. coli*.	**40**
Figure 24 : les dilution des antibiotiques, **a** : Tétracycline, **b** : Pénicilline et **c** : Sulfamide utilisées dans l'examen de l'activité antimicrobienne.	**40**
Figure 25 : Application des disques	**42**

VI. Résultats et discussion

Figure 26 : Effet antimicrobien des huiles essentielles de pelle de grenade sur les bactéries de : (a) *S. aureus* et (b) *E. coli*.	**47**
Figure 27 : Histogramme de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pelle de grenade sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli*.	**48**
Figure 28: Antibiogramme de *S. aureus* et et *E. coli*.	**49**
Figure 29 : Histogramme de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Pénicilline sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli.*	**51**
Figure 30 : Histogramme de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Tétracycline sur les bactéries de *S. aureus* et *E. coli.*	**52**
Figure 31 : Histogramme de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Sulfamide sur les bactéries de *S. aureus* et *E. coli.*	**54**

Figure 32: Histogramme de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pelle de grenade et les antibiotiques sur la bactérie *S. aureus*.	**55**
Figure 33 : Histogramme de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pelle de grenade et les antibiotiques sur la bactérie *E. coli*.	**58**

Listes des tableaux

Liste des tableaux :

Partie	Page
I. La grenade	
II. Les huiles essentielles	
III. Les bactéries pathogènes dans le tube digestif	
Tableau I : Caractères distinctifs de *Staphylococcus aureus*	**21**
IV. Les antibiotiques	
V. Matériel et méthodes	
Tableau II : Les principales caractéristiques culturales de la variété maxima rubra	**31**
Tableau III : Les micro-organismes utilisés dans le test d'antagonisme.	**32**
Tableau IV : Les caractéristiques macroscopiques des colonies de deux bactéries.	**33**
Tableau V: Les caractéristiques microscopiques de deux espèces bactériennes étudiées.	**34**
Tableau VI : Les différentes concentrations de la dilution des huiles essentielles utilisées dans l'examen de l'activité antimicrobienne.	**39**
Tableau VII : Les différentes concentrations de la dilution des antibiotiques utilisées dans l'examen de l'activité antimicrobienne.	**41**
Tableau VIII : Dispositif expérimental représente le test *in vitro* de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des antibiotiques étudiés.	**42**
VI. Résultats et discussion	
Tableau IX : Résultats de l'activité antimicrobienne (Ii) des huiles essentielles de pelle de grenade sur les bactéries testées *S. aureus* et *E. coli* après 48heures d'incubation.	**47**
Tableau X : Les différentes moyennes de (Ii) obtenues de l'activité antimicrobienne du traitement Pénicilline sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli.*	**50**
Tableau XI : Les différentes (Ii) moyennes obtenues de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Tétracycline sur les bactéries de *S. aureus* et *E. coli.*	**52**
Tableau XII : Les différentes (Ii) moyennes obtenues de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Sulfamide sur les bactéries de *S. aureus* et *E. coli.*	**53**

Liste des tableaux :

Tableau XIII : Les différentes (Ii) moyennes obtenues de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pelle de grenade et les antibiotiques sur la bactérie *S. aureus*.	**55**
Tableau XIV : Les différentes moyennes de (Ii) obtenues de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pelle de grenade et les antibiotiques sur la bactérie *E. coli*.	**57**

Les abréviations

Liste des abréviations :

Abréviation	Signification
AAF	Aérobie-anaérobie facultatif
ADN	Acide désoxyribonucléique
APG	Angiosperm Phylogeny Group
ATB	Antibiotique
BP	Baird-Parker
CMI	Concentration minimale inhibitrice
°C	Degré Celsius
C	Concentration
cm	Centimètre
CO2	gazcarbonique
DO	Densité Optique
d.d.l	degré de liberté
E coli	Escherichia coli
ED	Eau distillée
EMB	Eosine Bleu de Méthylène
GLU	Glucuronidase
g	Gramme
H	Heure
H2O	Eau
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HE	Huile essentielle
LDL	Lipoprotéines de petite densité
IC	Intervalle de Confiance
Ii	Indice d'inhibition
InPEC	les pathogènes intestinaux
INRAA	Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie
ISO	Organisation internationale de normalisation
LDC	Lysine décarboxylase
L	Litre
mL	Millilitre
m	Mètre
mm	Millimètre
mg	Milligramme
NaCl	Chlorure de Sodium
ODC	Ornithine décarboxylase
P. granatum	*Punica granatum*
P	Pénicilline
(P)	le degré de signification
PSA	Prostate Specific Antigen
PAM	Plantes aromatiques médicinales
PLP	Protéines liant les pénicillines
S	Sulfamide
S. aureus	Staphylococcus aureus

T	Tétracycline
TSA	Trypticase-caséine-soja
Trs/min	Tours/minute
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-Violet
µm	Micromètre
µg	Microgramme
VRBL	Lactose bile cristal violet et rouge neutre
(+)	Positive
$\overline{(x)}$	La moyenne
(ε)	Ecart type
(s^2)	La variance

Introduction

Introduction :

Les animaux peuvent être malades, tout comme les humains. Les maladies sont parfois causées par des bactéries. De bonnes pratiques contribuent à prévenir les maladies, mais les antibiotiques sont parfois nécessaires pour traiter ou éviter efficacement les infections bactériennes. Ils aident les humains et les animaux à retrouver la santé et contribuent ainsi à leur bien-être.

L'antibio-résistance apparaît lorsqu'un antibiotique ne parvient plus à tuer certaines bactéries ou à freiner leur croissance. Elle peut se manifester tant dans le domaine de la médecine humaine que dans celui de la médecine vétérinaire. Alors que certaines bactéries résistent naturellement à certains antibiotiques, d'autres peuvent acquérir de la résistance avec le temps. Tout usage d'antibiotiques, même justifié et judicieux, peut favoriser l'apparition de bactéries résistantes. Ces antibiotiques deviennent alors moins efficaces. Lorsqu'une bactérie est résistante à plusieurs antibiotiques, on dit qu'elle est multi-résistante.

Cette situation est problématique car les choix d'antibiotiques sont alors très limités pour traiter une infection. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques peut rendre plus difficile le traitement d'une infection, tant chez les humains que chez les animaux **(*)(1).** Les antibiotiques peuvent avoir des effets indésirables: réactions allergiques, diarrhée, nausées, apparition d'une mycose, toxicité hépatique, neurologique, sanguine, auditive, rénale, qui limitent leur emploi ultérieur **(**)(2).** Une huile essentielle est un produit odorant, de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage**[1].** Les végétaux riches en essences se trouvent surtout chez les Conifères, Myrtacées, Labiées, Ombellifères et Rutacées au niveau de différents organes de la plante **[2].** La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire **[3].** Ces huiles ont une activité biologique et thérapeutique aussi variée, par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses**[4].**

Parmi les plantes médicinales de la flore Algérienne, *Punica granatum*, dont elle a plusieurs utilisations (culinaire, pharmaceutique, etc.). Une recherche dans des

travaux sur les plantes médicinales et aromatiques nous a permis de trouvé quelques études sur les propriétés biologiques de l'huile essentielle extraite des pelles de la grenade.

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite des pelles de *Punica granatum* sur deux germes qui sont fortement pathogènes pour l'homme que pour l'animal, *S. aureus* et *E. coli* , dont le but de tester l'effet inhibitrice en comparant cette activité avec l'effet antagoniste de trois antibiotiques choisis (Pénicilline, Tétracycline et Sulfamide).

Généralités

I. La grenade :

I.1. Historique :

Depuis des milliers d'années, le grenadier, *Punica granatum*, ses fruits, ses graines, son écorce et ses fleurs, sont utilisés, au Moyen-Orient et en Asie, régions dont cet arbuste est originaire, pour leurs propriétés médicinales. Prescrit de façon empirique dans les médecines traditionnelles pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires, le grenadier fait son apparition dans la pharmacothérapie française en 1818 **[5].**

I.2. Description de la grenade :

I.2.1. Origine :

La grenade (*Punica granatum* L.) est le membre principal de la famille des Punicaceae, qui partage sa famille botanique uniquement avec *Punica protopunica* (grenadier de Socotra). Ce dernier est recensé exclusivement sur l'île de Socotra, située dans l'océan Indien, au large des côtes de Somalie **[6].** Plus de 1000 cultivars de *P. granatum* existent. Ce fruit est originaire d'Iran et d'Afghanistan, où le grenadier croît de façon spontanée depuis plus de 4000 ans. Aujourd'hui sa culture s'étend à tout le bassin Méditerranéen, à la Chine, l'Inde, et au sud-ouest américain (Californie et Mexique) **[7].**

I.2.2. Production mondiale :

Dans le monde, les plus importants producteurs de grenades sont les pays d'Orient dont l'Iran (production annuelle de 665 000 tonnes [2003]), la Turquie, la Transcaucasie et l'Inde, mais aussi dans la zone méditerranéenne la Tunisie, le Maroc, l'Espagne, l'Italie et la Grèce. Aux Etats-Unis et plus particulièrement en Californie, la culture de la grenade est également très développée **[8].**

I.2.3. Production en Algérie :

En Algérie, l'arboriculture fruitière est très diversifiée. Elle est constituée de plusieurs espèces comme le grenadier. Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations de ce fruit en Algérie ne sont pas très importantes.

En Algérie il existe 14 variétés homologuées de grenadier. Parmi elles, seulement 4 variétés sont réellement utilisées **[9].**

Selon l'INRAA, plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardins et vergers dans le payé, on ne connaît que leur appellation locale (Lahlou, Elmouze, Elqares,..) **[9].**

I.2.4. Le fruit :

La grenade, fruit du grenadier, est délimitée par un péricarpe épais (ou peau), à l'intérieur duquel sont contenus de nombreux arilles. Chacun est constitué d'une graine (ou pépin) entourée de jus translucide contenu par une très fine membrane. Les arilles sont rencontrés dans des loges séparées par de minces membranes qui s'étendent à l'intérieur du fruit, prenant naissance au niveau du péricarpe et constituant ainsi une base pour l'attachement des arilles **(Figure 1) [10].** Le fruit donne donc naissance à trois parties bien distinctes: les pépins (environ 3% du poids du fruit) qui contiennent eux-mêmes 20% d'huile, le jus (environ 30% du poids du fruit) et la peau qui comprend également les membranes intérieures, dont la composition phytochimique est détaillée dans les paragraphes suivants **[11].**

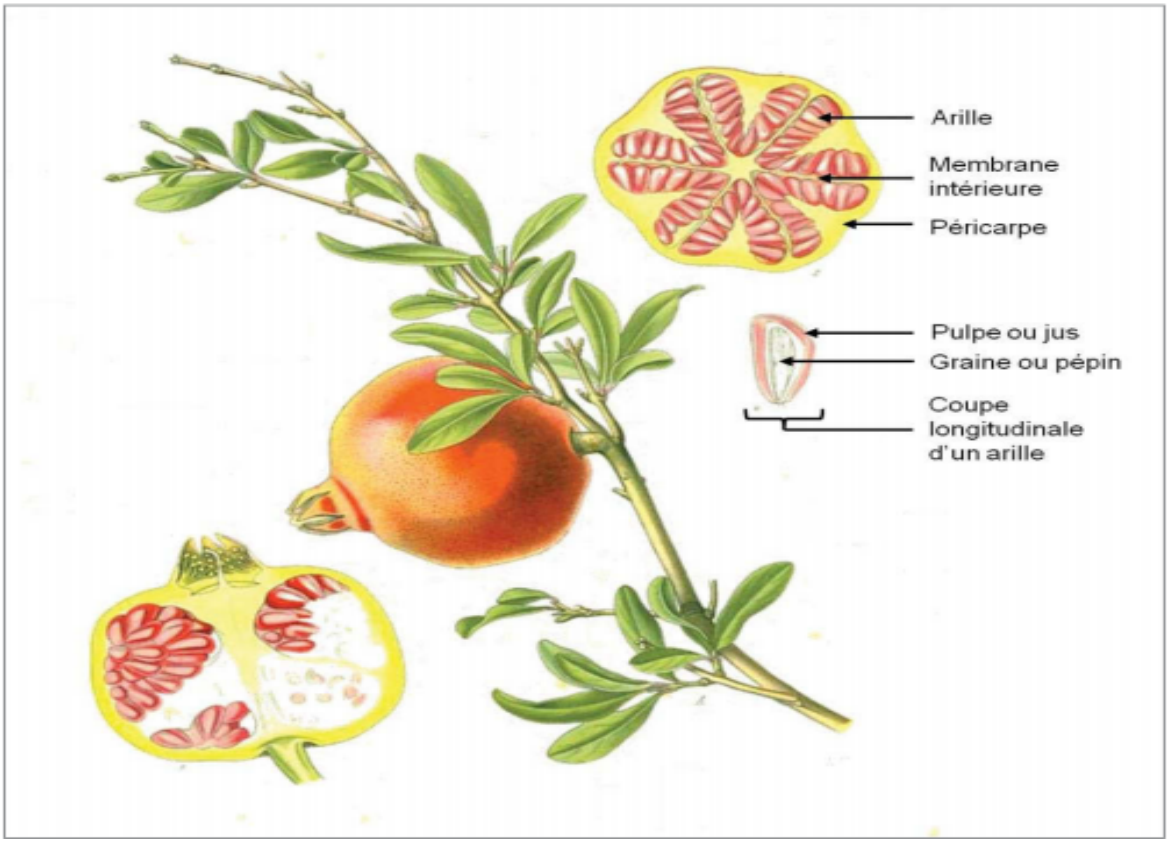


Figure 1 : Planche anatomique de la grenade, définition des différentes parties du fruit **[6].**

I.2.5. Intérêt thérapeutique :

Depuis une dizaine d'années, Le grenadier a fait l'objet de plusieurs intérêt médical et pharmacologique que pour des objectifs cosmétologiques. En effet, sa richesse particulière en micronutriments dotés de propriétés potentiellement intéressantes pour la santé lui confère un atout non négligeable dans les stratégies de prévention du développement des principales maladies chroniques. En effet, la consommation de grenade est envisagée dans le cadre de la prise en charge de certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (effets anti-athérogènes) **[12]**, le diabète **[13]**, le surpoids **[14]**, la dysfonction érectile **[15]**, l'hygiène buccale **[16]** et même pour les cancers du sein, de la prostate et du colon du fait de son activité chémopréventive **[17].** Les scientifiques tentent actuellement d'élucider les mécanismes impliqués dans les effets biologiques constatés de ce fruit ou de ses constituants, dans le cadre d'une démarche de recherches transrationnelles.

Connue depuis plus de 4000 ans, ce fruit a fait l'objet d'un grand nombre de croyances et d'utilisations dans le domaine médical. En effet, la grenade était considérée comme un symbole de vie, longévité, santé, féminité, fécondité, connaissance, morale et de spiritualité, si ce n'est de Divinité **[6].** Dans la culture égyptienne antique, la grenade était considérée comme un reflet de la prospérité et de l'ambition. C'est pourquoi des représentations de la plante étaient couramment utilisées pour décorer les sarcophages. En médecine ayurvédique, la grenade était considérée comme «une pharmacie en tant que telle». L'écorce et les racines auraient des propriétés vermifuges et antiparasitaires. La peau serait un puissant astringent et remède contre la diarrhée et les aphtes oraux **[18].** Les auteurs d'Inde **[19]**, de Tunisie **[20]**, et du Guatemala **[21]**, indiquaient que les pelures séchées étaient consommées en décoction dans de l'eau pour les mêmes affections que citées précédemment. Des mélanges de pépins, jus et peau de grenade ont paradoxalement montré des effets contraceptifs **[22].** Dans la médecine unani, un système médical traditionnel du Moyen-Orient, les fleurs de grenade servaient de remède pour le diabète mellitus **[23].**

I.2.6. Classification :

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, est créée par un groupe de botanistes, l'APG. Cette classification phylogénétique réorganise le règne végétal en fonction de critères moléculaires, s'intéressant essentiellement

à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et d'un gène nucléaire de ribosome. Ainsi, pour certaines espèces végétales, les résultats moléculaires sont en accord avec les anciennes classifications alors que pour d'autres espèces végétales.

Dans la systématique. Ces résultats reconsidèrent la phylogénie des plantes. Cette nouvelle organisation se compose alors de 462 familles réparties dans 40 ordres (***). Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Il convient donc de retenir que dans cette nouvelle classification, la famille des Punicacées n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des Lythracées, famille comportant 30 genres et 600 espèces. **(***)(3).**

- **Embranchement :** Spermaphytes
- **Sous-embranchement :** Angiospermes
- **Classe :** Dicotylédones vraies
- **Sous-classe :** Rosidées
- **Ordre :** Myrtales
- **Famille :** Lythraceae
- **Genre :** *Punica*
- **Espèce :** *Punica granatum*

I.3. Composition des différentes fractions du fruit :

De manière générale, la composition de la partie comestible de la grenade est bien décrite. En ce qui concerne la peau du fruit et les pépins, seules certaines classes de molécules ont été relativement bien étudiées. Chacun de ses compartiments possède des constituants spécifiques **(Figure 2)** dont les teneurs dépendent de la variété, la saison, le stade de maturité, ainsi que du lieu géographique et des conditions de culture **[24].**

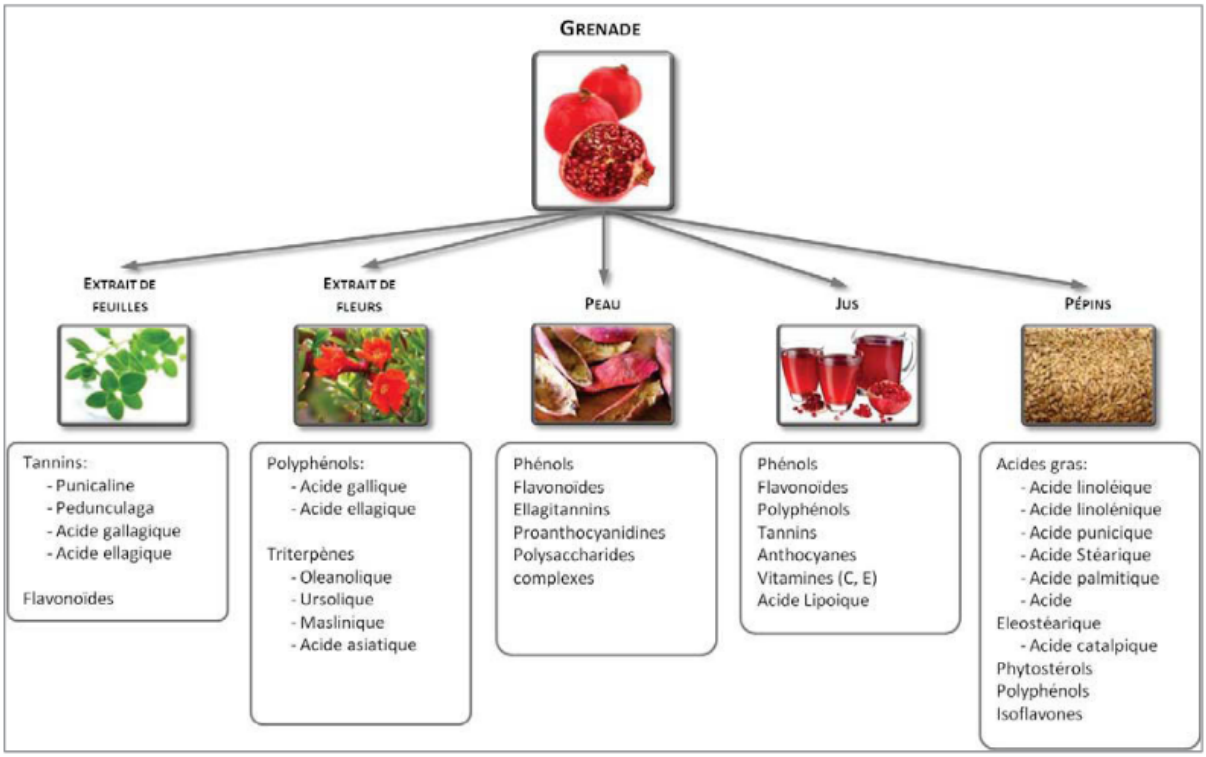


Figure 2 : Principaux constituants des différentes parties de la grenade ou de leur extrait **[25].**

I.3.1. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles **[26].**

La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) **[27].**

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel **[27]**.

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) **[27]**.

I.3.2. Classification des phénols :

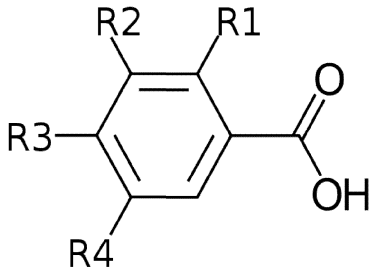
I.3.2.1. Phénols simples :

I.3.2.1.1. Acides phénoliques :

Un acide phénolique (ou acide-phénol) est un composé organique qui possède au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Chez les plantes, ces acides dérivent de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique **[28].**

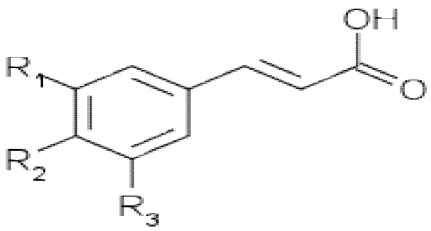
Acides benzoïques

	R1	**R2**	**R3**	**R4**
acide para hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
acide protocatéchique	H	OH	OH	H
acide vanillique	H	OCH3	OH	H
acide gallique	H	OH	OH	OH
acide syringique	H	OCH3	OH	OCH3
acide salicylique	OH	H	H	H
acide gentisique	OH	H	H	OH



Acides cinnamiques

	R1	**R2**	**R3**
acide paracoumarique	H	OH	H
acide caféique	OH	OH	H
acide férulique	OCH3	OH	H
acide sinapique	OCH3	OH	OCH3
E-anéthole	H	OCH3	H
acide 3,4-diméthoxycinnamique	OCH3	OCH3	H



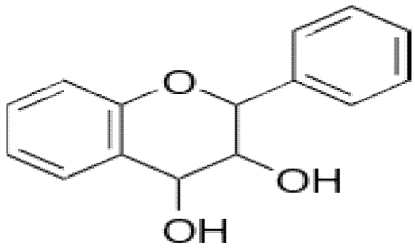
I.3.2.1.2. Les flavonoïdes :

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange **(****)(4)**, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune**) [29] [30].**

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique Chervreul en 1814, mais n'ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent- Györgyui **[31]**.

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "French paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées **[30] [32].**

Flavonoïdes



b. Les polyphénols des huiles essentielles de la grenade:

Les polyphénols sont répartit en plusieurs classes :

• Les flavonoïdes
• Les tanins
• Les stilbènes
• Les lignanes et les coumestanes
• Autres phytoestrogènes
• Les saponines (triterpenoïdes)
• Les phytostérols et les phytostanols.

Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates **[33].**

I.3.3. Potentiel santé des extraits de la grenade :

I.3.3.1. Activités thérapeutiques de la grenade :

Les propriétés thérapeutiques potentielles du grenadier sont très variées et incluent traitement et prévention du cancer, les maladies cardiovasculaires, diabète, dysfonctionnement érectile et protection contre les radiations ultraviolettes et autres. Ces

activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés: antioxydante, anticarcinogénique, anti-inflammatoire et antidiabétique du grenadier **[5].**

I.3.3.1.1. Activité antioxydant :

Des études *in-vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux **[34] [35].**

Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit **[36]**.

I.3.3.1.2. Activité anti-inflammatoire :

L'acide éllagique contenu dans un extrait de grenade, possède des pouvoirs anti-inflammatoires. Il permet de lutter contre l'inflammation tout en conservant les fonctions physiologiques des organes tels que le rein et l'estomac intactes.

De ce fait, il n'y a aucun risque de provoquer ou d'aggraver un ulcère de l'estomac en utilisant des extraits de grenade comme anti-inflammatoire pour soulager l'arthrose et les rhumatismes, pour traiter les pathologies auto-immunes ou pour réduire les inflammations chroniques de l'intestin.

Une étude *in-vivo* a démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase (principaux médiateurs de l'inflammation) **[34] [37] [38]**.

I.3.3.1.3. Activité anti-carcinogénique :

Des études *in-vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont démontré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire et inhibent le développent de la tumeur **[39].**

Une étude clinique effectuée sur 46 hommes ayant le cancer de prostate a illustré que 35% des patients montraient une diminution significative du taux sérique de PSA (Prostate Specific Antigen) durant le traitement avec du jus de grenade. Cette étude a indiqué que le grenadier

pourrait affecter le cancer de prostate grâce à la combinaison de ses propriétés antiproliférative, antioxydante et anti-inflammatoire **[40].**

I.3.3.1.4. Activité antidiabétique :

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l'absorption et augmente l'excrétion du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL en améliorant les ratios : cholestérol total/HDL et LDL/HDL. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques **[41]** sans affecter les paramètres diabétiques **[42] [43].**

I.3.3.2. Autres effets de la grenade sur la santé : [44] [45] [46] [47] [48].

I.3.3.2.1. Problème cardiovasculaire :

La prise fréquente d'un jus de grenade fait maintenir une bonne circulation du sang dans le corps. Ceci, diminue le risque de crise cardiaque. Aussi, il a été prouvé que l'extrait de grenade diminue la pression du sang d'un patient sous hémodialyse.

I.3.3.2.2. Problème de l'estomac:

Les écorces de grenades et les feuilles sont utilisées pour calmer les troubles de l'estomac ou la diarrhée. Le jus de la grenade a aussi été utilisé pour alléger les problèmes de colique et choléra.

I.3.3.2.3. Problème dentaire:

Le meilleur avantage d'un jus de grenade est qu'il a une activité antibactérienne remarquable ce qui aide à réduire les effets des plaques dentales.

I.3.3.2.4. Trouble d'Alzheimer :

La consommation régulière selon un plan diététique d'un fruit de grenade en entier (toutes les parties) peut retarder la déficience mentale et comporte mentale dans la maladie d'Alzheimer.

I.3.3.3. Applications industrielles de la grenade [49] :

- Jus de grenade, Confitures, vinaigres et liqueurs.
- Produits nutraceutiques à base d'extrait d'écorce.
- Condiments et épices alimentaires.

Les usages cosmétiques de la grenade sont multiples comme antibactérien. Une étude a montré que l'extraits aqueux de grenade (surtout de pelure) encourage et renforce la régénération du derme. Cependant, l'huile des graines de la grenade améliore la régénération d'épiderme **[50].** Aussi, l'application d'un extrait de grenade sur une peau humaine reconstituée apporte une protection très efficace contre radiation UV **[51].**

Les extraits du fruit de grenade ont été utilisés pour préparer des teintures et l'extrait des feuilles a été utilisé pour préparer dans les temps anciens de l'encre **[52].** Une étude récente reporte que la pelure de grenade a montré un pouvoir remarquable pour l'adsorption de quelques colorants **[53]** et dans une nouvelle étude, les chercheurs suggèrent que des films de chitosane préparés par ajout d'extrait d'écorce de grenade et de menthe peuvent être utilisés pour le développement de matériaux d'emballage des aliments actifs **[54].**

II. Les huiles essentielles :

II.1. Définition et caractéristiques des huiles essentielles :

Ce sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie qui est aromathérapie **[55].** Au point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les huiles essentielles sont constitues de différents composants comme les terpènes, esters, cétones, phénols, et d'autres éléments **[55].**

Les HEs sont très réfringentes, hydrophobes et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tende à se collecter en gouttelettes de grosse taille. Par contre, elles sont solubles dans les solvants (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) des lipides et, à l'inverse des glycérides, dans l'alcool **[55].**

La popularité dont jouissent depuis longtemps les huiles essentielles et les plantes aromatiques en général reste liée à leurs propriétés médicinales en l'occurrence les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides et insectifuges, tonifiantes, stimulantes, calmantes, etc. **[56].**

D'autres parts, les huiles essentielles sont des substances très actives et par ailleurs elles peuvent être toxiques. Leur toxicité est liée à la présence de certains sites fonctionnels oxygénés **[57].** Parmi leurs propriétés indésirables, on peut souligner entre autres : les propriétés vésicantes, nécrosantes, allergiques, hépatotoxique, carcingéniques, photo sensibilisantes, neurotoxiques et néphrotoxiques **[57].**

Leur utilisation devrait être basée sur les connaissances fiables et suffisantes apportées par la recherche scientifique bien menée. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes afin d'en étudier l'efficacité, le mode d'action et évidemment les effets secondaires **[57].**

II.2. Les activités antibactériennes des huiles essentielles :

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix **[58].** Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes **[59].** Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre **[60].**

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire **[59].** Les bactéries qui sont résistantes à certains antibiotiques, peuvent être parfois inhibées par les huiles essentielles. D'après l'équipe de **[61].**

L'action antibactérienne des HEs se déroule en trois phases **[62] :**

- Attaque de la paroi bactérienne par les huiles essentielles (HE), provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

II.3. Méthodes d'extraction :

L'extraction des composés bioactifs à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des

composés phénoliques. En conséquence, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction de composés phénoliques de source végétale **[63].**

II.3.1. Extraction par hydro-distillation :

L'hydro-distillation est l'un des procédés les plus simples et le plus ancien appliqué pour l'extraction des huiles essentiels des plantes. Il repose sur le fait que la plupart des matières odorantes volatiles peuvent être entraînées à la vapeur d'eau pour être séparées ultérieurement. Actuellement, pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, les techniciens ont mis au point le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche.

L'extraction par entrainement à la vapeur des composés volatils bioactifs tel alcool, mono-terpène, aldéhyde présents dans le jus de plusieurs variétés espagnoles de grenade a été étudiées par **[64].** Récemment, la technique hydro-distillation assistée par micro-onde s'y montrée la plus efficace et la plus économique pour l'extraction de composés bioactifs présents dans des plantes fraiches **[65].**

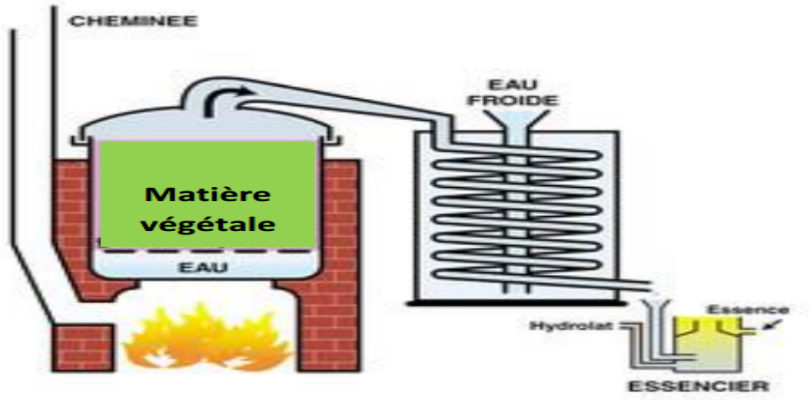


Figure 3: Montage d'Hydro-distillation **[66].**

II.3.2. Extraction par solvant:

Cette méthode est basée sur le pouvoir solubilisant du solvant et de sa sélectivité vis-à-vis des composés à extraire de la matière végétale. La macération, l'infusion et la décoction sont toutes des méthodes d'extraction par solvant. Généralement les solvants sont classés par polarité. Les solvants polaires comme l'eau, éthanol, méthanol, acétone qui solubilisent les molécules polaires. Et les solvants apolaires comme l'hexane, l'acétate d'éther, chloroforme qui solubilisent les substances apolaires **(*****)(5).**

Parmi plusieurs techniques d'extraction par solvant étudiée, la meilleure méthode d'extraction qui n'affecte pas le potentiel antioxydant des plantes est celle par solvant **[67].**

La méthode de décoction par eau chaude s'est avérée très rentable en terme de qualité des antioxydants et de prix **[68].**

L'extraction des écorces et des autres parties de grenade par solvant peut être réalisée à chaud ou à froid **[69].**

II.3.3. Extraction par soxhlet :

Pour l'extraction de composés organiques on utilise parfois des appareils plus efficaces tels les extracteurs de Soxhlet qui utilisent préférentiellement les solvants selon leur volatilité. Cette technique a été bien exploitée pour les feuilles de la grenade **[70].** De plus l'extraction par chauffage à reflux a été aussi employée pour la grenade **[42].**

II.3.4. Extraction par ultrason :

Le processus d'extraction assisté par chauffage à ultrason est une technique récente largement utilisée pour les substances végétales. Elle requière un temps d'extraction très réduit et une énergie moindre. L'extraction de la pelure de la grenade a été investiguéepour récupérer plusieurs composés bioactifs **[71].**

II.3.5. Extraction par Fluide Supercritique :

Il s'agit d'un procédé d'extraction très récent opérant à froid en utilisant un fluide sous des conditions particulières bien définies. Par exemple le gaz carbonique (CO_2) sous pression élevée et à température supérieure à 31°C, il se trouve dans un état dit« supercritique », intermédiaire entre le gaz et le liquide. Dans cet état, le CO_2 présente la particularité de dissoudre de nombreux composés organiques. Cette propriété a été mise à profit pour extraire plusieurs matières premières végétales dont la grenade a fait partie **[63]**.

III. Les bactéries pathogènes dans le tube digestif :

III.1. La flore intestinale et maladies du tube digestif :

L'appareil digestif vit en symbiose avec la flore intestinale, aujourd'hui appelée microbiote intestinal. Le microbiote est composé de quelques cent mille milliards de bactéries, et joue de nombreux rôles indispensables. Véritable barrière de l'organisme contre la colonisation par des bactéries pathogènes, il permet aussi la stimulation permanente du système immunitaire et contribue ainsi à maintenir l'intégrité intestinale. Les maladies du tube digestif peuvent être nombreuses et avoir différentes origines. Des modifications de la composition du microbiote intestinal pourraient être impliquées dans certaines maladies comme des diarrhées mais aussi certains cancers, des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. D'autres pathologies

comme les ulcères, la cholécystite, les sigmoïdites peuvent résulter de la colonisation par des bactéries pathogènes. Les infections bactériennes du tube digestif peuvent être causées par des bactéries très différentes **(******)(6).**

III.2. *Escherichia coli* commensale et pathogène :

III.2.1. Espèce *E. coli* :

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois la bactérie *Escherichia coli*, bactérie isolée à partir de selles de nourrissons, qu'il nomma tout d'abord *Bacterium coli* commune. Ce n'est que 70 ans plus tard que le nom d'*Escherichia coli* (*E. coli*) est réellement retenu en hommage aux travaux d' Escherich **[73].**

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, appartenant à la classe des protéobactéries. En plus de l'espèce *E. coli*, il existe au sein du genre *Escherichia* cinq autres espèces : *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce présente des caractéristiques biochimiques spécifiques qui permettent de les différencier. Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. *E. coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja). *E. coli* est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la glucuronidase (Glu). La majorité des souches fermente le sorbitol. La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E. coli* en dehors du sérotype O157 :H7 qui ne fermente pas le sorbitol, à l'exception de certains mutants qui ont la capacité de fermenter ce sucre **[74]** et qui sont dépourvus de l'activité Glu. Ces caractéristiques particulières sont utilisées pour sa recherche et son isolement dans l'environnement et l'alimentation (ISO 16654:2001).

E. coli constitue une espèce bactérienne sous-dominante du microbiote aérobie-anaérobie facultatif intestinale de l'Homme et des animaux. Cette bactérie représente 80 à 90 % des coliformes thermotolérants ou coliformes fécaux (capables de fermenter le lactose à 44,5°C) qui constituent un sous-groupe des coliformes totaux. Enfin, l'espèce *E. coli* est une bactérie

versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement **[75].**



Figure 4 : *Escherichia coli* **[76]**

III.2.2. Notion d'habitat primaire et d'habitat secondaire :

III.2.2.1. Habitat primaire :

E. coli appartient à la microflore commensale de l'homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud (carnivores, omnivores, herbivores et oiseaux) mais également des reptiles **[77].** Le tractus digestif constitue son habitat primaire. Cette bactérie est présente principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations environ 10^6 UFC/g de contenu intestinal **[73].**

III.2.2.2. Habitat secondaire :

E. coli est rejeté dans l'environnement via les fèces à une concentration d'environ 10^8 UFC/g de fèces **[78].** Il se retrouve dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les fumiers des animaux d'élevage ou par les déjections des animaux d'élevage ou des animaux sauvages.

La population d'*E. coli* dans l'habitat secondaire se renouvelle par les apports de bactéries provenant de l'habitat primaire. Une minorité d'*E. coli* est capable de coloniser et de persister dans l'environnement hors de son hôte **[79].** Cette population d'*E. coli* dite colonisatrice de l'environnement est qualifiée de population naturalisée **[80]** ou de coliformes du microbiote

environnemental **(Figure 3) [79].** Si cette population naturalisée s'établit dans le temps, elle devient une nouvelle communauté microbienne autochtone.

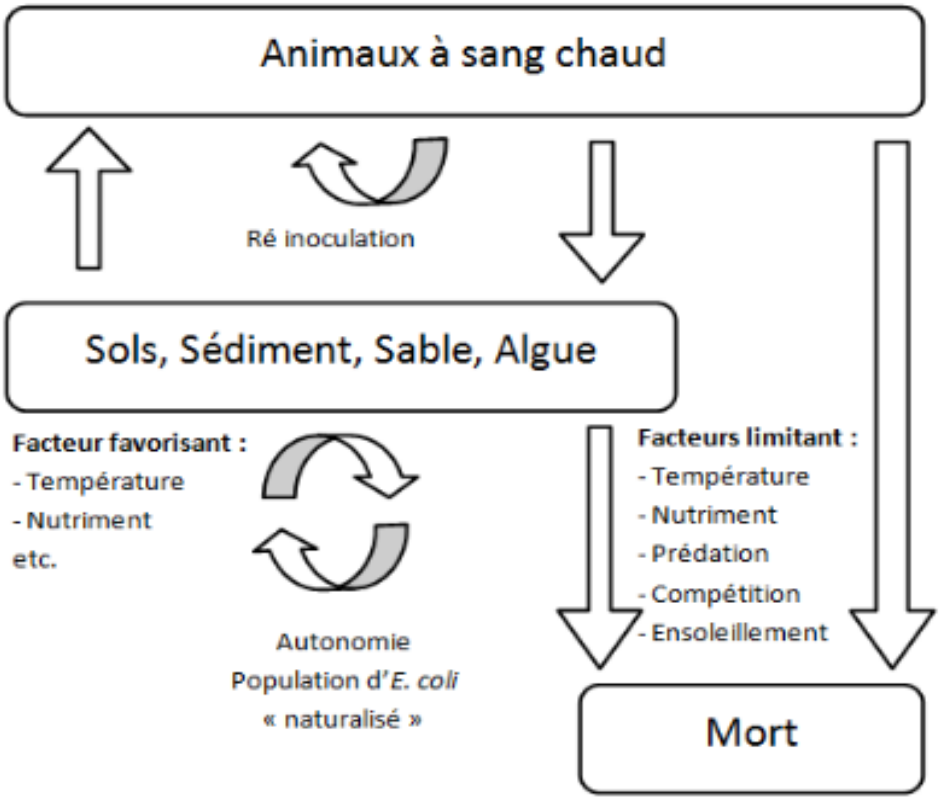


Figure 5 : Cycle de vie d'*E. coli* **[81].**

III.2.3. *E. coli* pathogène :

Les souches d'*E. coli* pathogènes sont capables de se multiplier et de persister dans le tractus digestif de l'hôte en contournant les défenses immunitaires et d'induire des dommages cellulaires. L'étude des différents modes d'interactions entre l'hôte et la bactérie lors des infections permet de classer les souches d'*E. coli* pathogènes en deux principaux pathotypes regroupant les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC), responsables d'infections urinaires, de méningites chez les nouveaux-nés ou de septicémies et les pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de maladies entériques **[82].**

III.3. *Staphylococcus aureus* :

III.3.1. Morphologie :

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,5 à 1,5µm de diamètre, ce n'est qu'au cours de la lyse ou de la dégénérescence (veilles cellules), que parfois

les cellules perdent leur affinité tinctoriale et peuvent devenir à Gram variable **[83].** Ainsi, ils sont immobiles, non sporulés, ne possédant pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'une pseudo capsule **[84].**

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" **[85]** Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (en générale de 3 à 5 éléments) **[84].**

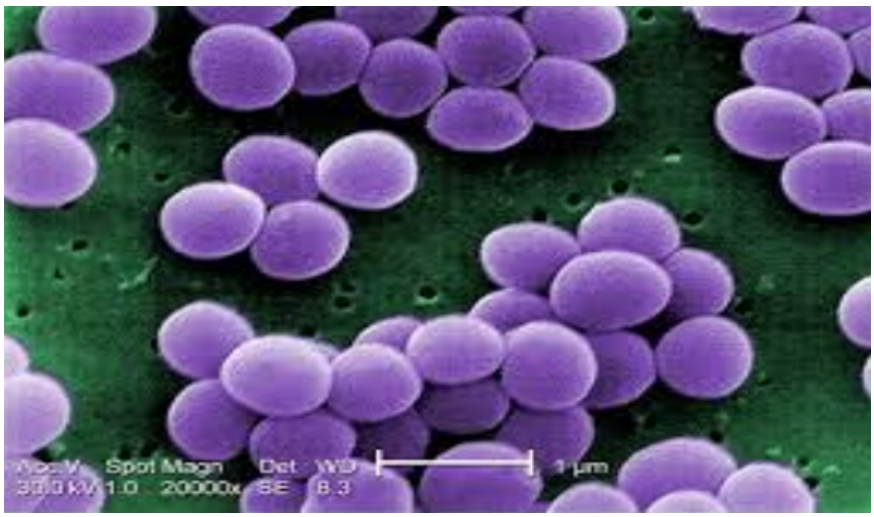


Figure 6 : Aspect de *S. aureus* au microscopie électronique (X 20000)

III.3.2. Caractères culturaux :

Peu exigeants sur le plan nutritif, les staphylocoques sont aérobies anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO_2 pour croître), et croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. Certains facteurs de croissance sont indispensables (Vitamine B1, acide nicotinique) mais ils n'exigent pas de biotine ni de tryptophane, ils poussent en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et un de quatorze acides aminés dont la cystéine, la thiamine et l'acide nicotinique.

La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7.5, mais de grandes variations sont tolérées **[84].** En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un

trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide **[84].**

Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de NaCl jusqu'à 7,5% (qui inhibe pour cette raison, la plupart des autres germes), ce milieu sélectif rendu différentiel par l'addition de Mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol, permet à la fois d'isoler le staphylocoque à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et nous oriente vers un *S. aureus* ou un *S. epidermidis* **[84].**

III.3.3. Caractères physiologiques et biochimiques :

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le tellurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine **[84].** De plus, la plupart des souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque **[84].**

S. aureus possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques. Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés; (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobiose ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis* **[84].**
Cependant, la production de pigments (caractères culturaux), d'hémolyse et la dégradation du mannitol n'ont pas toujours lieu, ce sont des indices auxquels on ne peut se fier pour identifier le germe de façon certaine. Il faut donc procéder à son identification par l'étude de différentes propriétés biologiques et biochimiques **[85].**

Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylocoagulase **(Tableau I) [86].** Cependant, certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* **[84].**

Tableau I : Caractères distinctifs de *Staphylococcus aureus* **[85].**

Caractères distinctifs	Espèce *S. aureus*	Autres espèces de staphylocoques
Aspects des colonies	Pigment doré	Blanches
Milieu de Chapman	Acidification de mannitol	Pas d'acidification du mannitol (Rouge) sauf *S. epidermidis*
Staphylocoagulase	Positive	Négative

III.3.4. Pouvoir pathogène de *S. aureus* :

S. aureus est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales et communautaires **[86].** Le mode principal de transmission est par contact direct avec des individus colonisés. En secteur hospitalier, le personnel soignant est une source importante de transmission de patient à patient **[87] (Figure 7).**

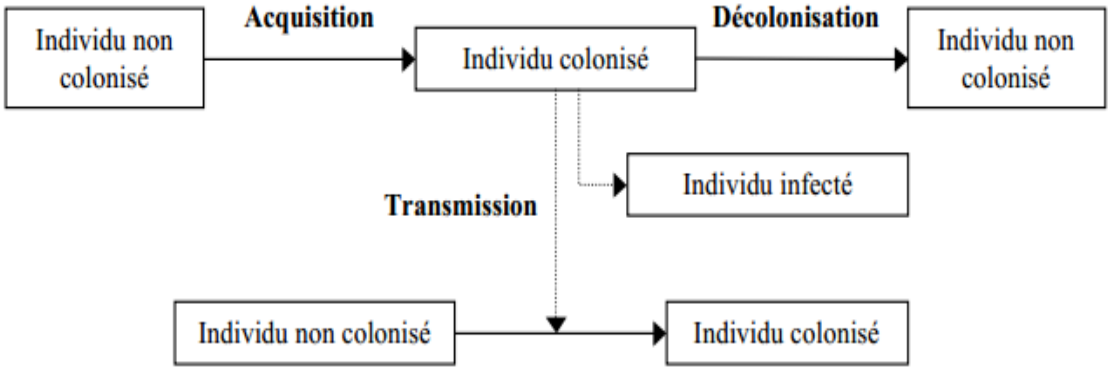


Figure 7 : Processus de diffusion de *S. aureus* **[88].**

Les infections suppuratives superficielles cutanéo-muqueuses tels les furoncles, les folliculites, les impétigos, les sinusites et les otites sont les plus couramment rencontrées. Ces infections peuvent se compliquer par une diffusion hématogène de la bactérie ou par une extension locorégionale de l'infection. *S. aureus* est aussi responsable de méningites, des infections respiratoires et urinaires **[89].**

Des infections non suppuratives d'origine toxique appelées toxémies staphylococciques sont, elles, dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé. Ces toxémies regroupent les syndromes cutanés staphylococciques par les exfoliatines, le choc toxique staphylococcique et les intoxications alimentaires par les entérotoxines **[89].**

En plus des infections aiguës, *S. aureus* peut provoquer des infections chroniques. La plupart d'entres elles sont dues à la capacité de ce pathogène à adhérer sur les implants médicaux temporaires (ex: cathéters) ou permanents (ex: prothèses orthopédiques, valves cardiaques) et à former un biofilm **[90].**

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides **[91].** La formation d'un biofilm de *S. aureus* est un processus qui se déroule en deux phases. La première phase consiste en l'attachement initial des cellules sur une surface, et la seconde à la multiplication et à la formation d'une communauté structurée, mature et multicouche des cellules bactériennes. Ces deux phases sont physiologiquement différentes l'une de l'autre et requièrent chacune des facteurs spécifiques. Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme **[92] (Figure 8).**

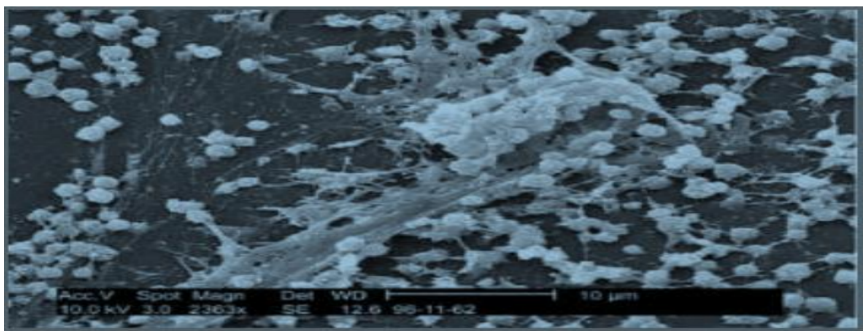


Figure 8 : Image obtenue par microscopie, image confocale d'un biofilm formé par *Staphylococcus spp*. à la surface d'un cathéter veineux **[84].**

IV. Les antibiotiques :

IV.1. Histoire de l'antibiothérapie :

La découverte des agents infectieux bactériens se fit à la fin du 19ème siècle, et stimule la recherche de traitements appropriés. Ce n'est qu'un siècle plus tard que la découverte des antibiotiques permit de lutter efficacement contre ces infections **[93].**
En 1937, la première molécule antibiotique efficace lancée sur le marché fut le Septoplix ® (sulfanilamide) faisant partie de la famille des sulfamides. Ce traitement d'origine synthétique, développé après la découverte de Dogmack sur l'efficacité antibiotique de la sulfamidochrysoïdine, colorant alimentaire, fut utilisé contre les streptocoques. Mais il présentait toutefois des limites en termes de sécurité et d'efficacité **[94] ;[93] ;[95].**
En 1928, Fleming fit une découverte surprenante : la croissance des souches de *Staphylococcus aureus* était inhibée en présence d'une moisissure bleue (du genre *Penicillium*). La pénicilline, substance produite par ces moisissures, venait d'être découverte. Elle fut commercialisée dans les années 1940. Cette molécule d'origine naturelle, très efficace, sauva la vie de nombreux soldats lors de la seconde guerre mondiale **[93] ;[95].**
Les deux décennies suivantes, de nouvelles classes d'antibiotiques n'ont cessé d'être découvertes, synthétisées, et commercialisées. Les années 1950, virent apparaître des molécules telles que la streptomycine (chef de file des aminosides), le chloramphénicol, des tétracyclines, macrolides, ou encore la vancomycine (antibiotique glycopeptidique). En 1962, le premier antibiotique de la famille des quinolones fut synthétisé : l'acide nalixidique **[93] ;[95].**
Au fil du temps, chaque famille d'antibiotique s'agrandit, avec des molécules ayant un spectre d'action de plus en plus large, et une pharmacologie améliorée. Ces médicaments révolutionnent le monde médical et on croit alors dans les années 1980 que les infections bactériennes feront bientôt partie du passé. Mais malgré le nombre incroyable de molécules disponibles, les infections bactériennes continuent d'attaquer l'homme, et des multi résistances émergent. Ces résistances, en plus de leur impact sur la santé publique, en menaçant la vie humaine et en engendrant des coûts énormes, ont eu des conséquences sur la recherche de nouvelles molécules antibiotiques. En effet, du fait du risque d'apparition de résistance, beaucoup de travaux sur de nouveaux antibiotiques ont été abandonnés par les laboratoires pharmaceutiques, et depuis les années 2000, très peu de nouvelles molécules ont été lancées sur le marché **[96].**

IV.2. Définition :

Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » **[97].** Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique **[98].** Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro-organismes.

Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes.

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur différents critères tels que leurs origines, leurs structures et leurs mécanismes d'action. L'action antibactérienne s'effectue selon quatre principaux mécanismes : une inhibition de la synthèse des constituants de la paroi, un blocage de la synthèse des protéines, un blocage de la synthèse des acides nucléiques et une altération du fonctionnement de la membrane cytoplasmique **(Figure 9) [99]**

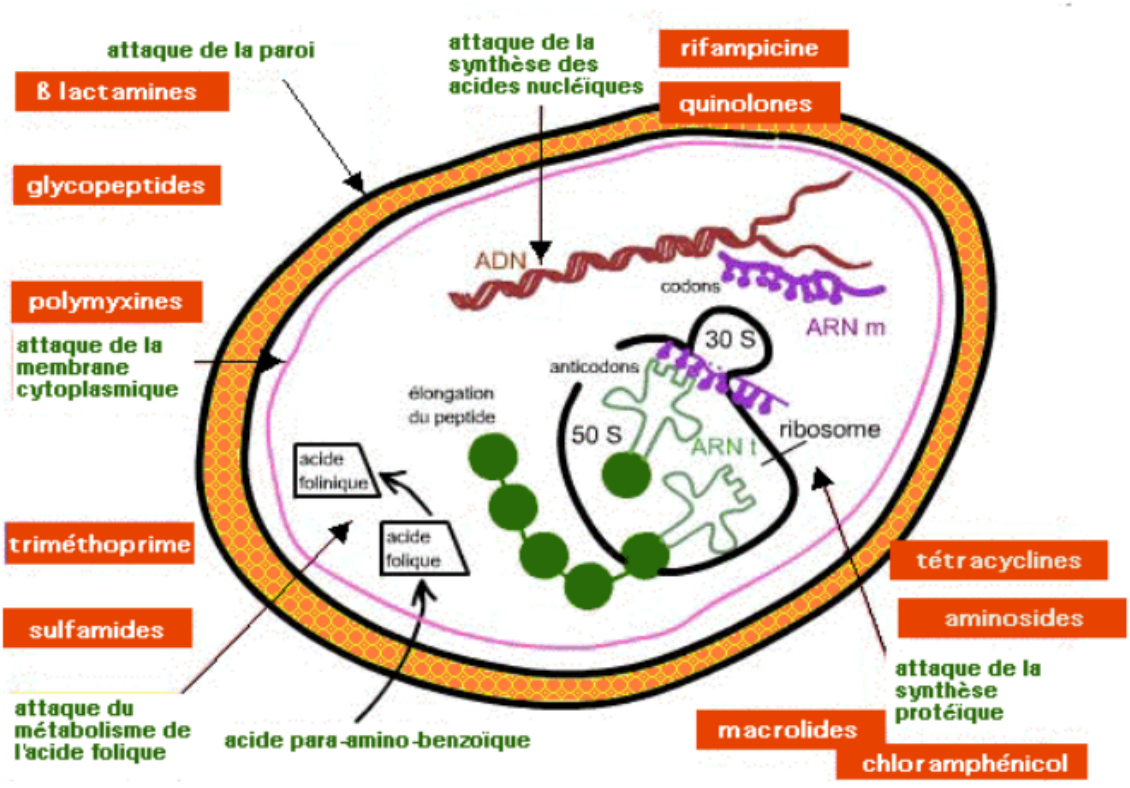


Figure 9 : Différents modes d'action des antibiotiques **[100].**

IV.3. La résistance aux antibiotiques :

IV.3.1. La résistance naturelle :

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle **[97].**

IV.3.2. La résistance acquise :

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine **[101].**

L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances **[102].** La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation.

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre **[103] (Figure 10).**

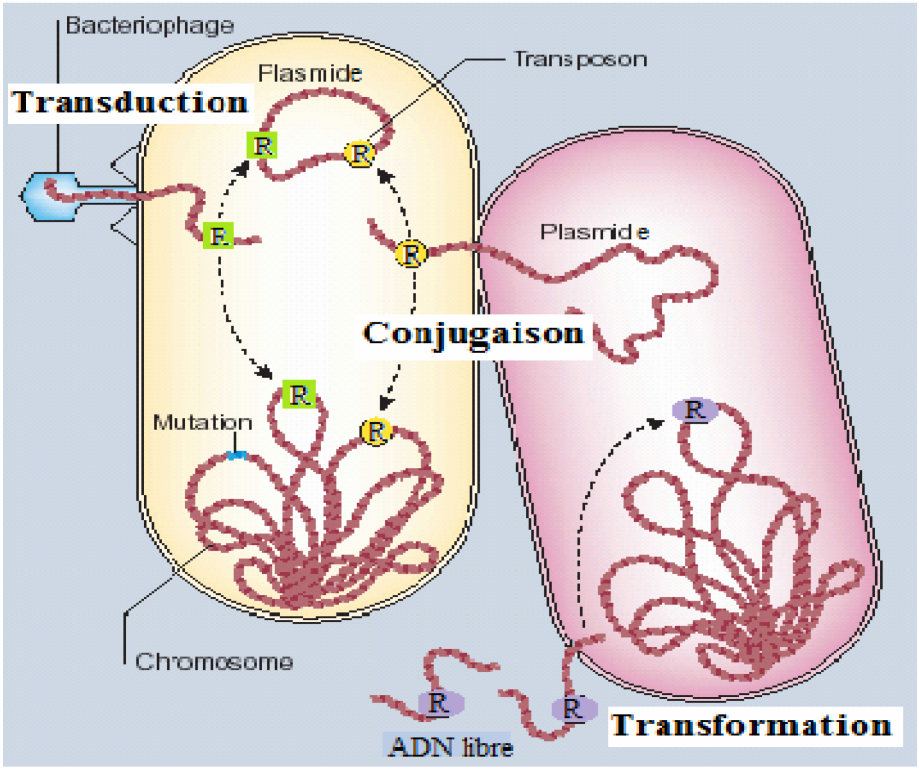


Figure 10 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries **[104].**

IV.4. Les mécanismes de résistance :

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances **(figure 10) [97].**

Aux niveaux physiologique et moléculaire, la résistance bactérienne est la résultante de trois phénomènes : la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique par diminution de la perméabilité membranaire et/ou sur-activation de l'efflux bactérien **(figure 11)**, l'inactivation des antibiotiques par dégradation ou modification enzymatique et l'altération de leurs cibles cellulaires **[97].**

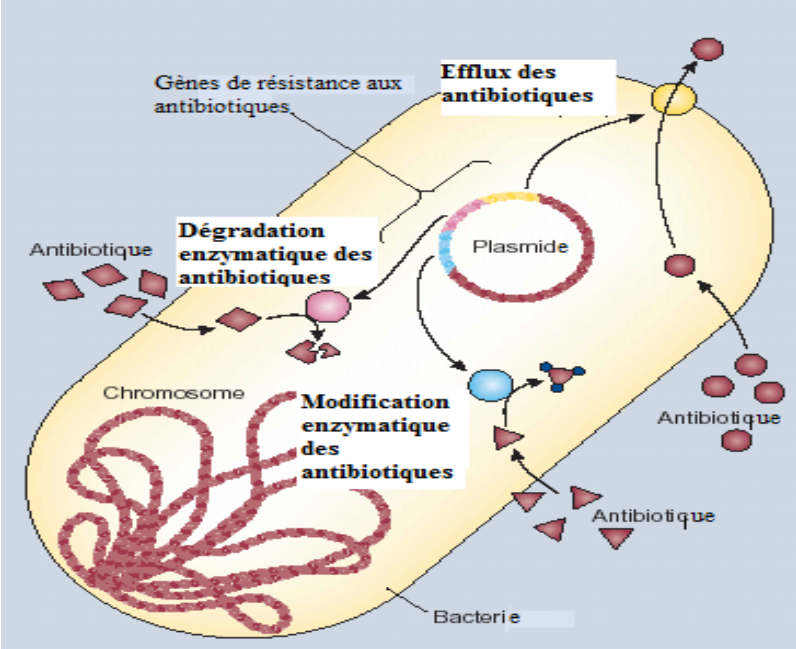


Figure 11 : L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance **[104].**

IV.5. L'antibiogramme :

IV.5.1. Définition :

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus **[105].**

IV.5.2. Le but de l'antibiogramme :

Le choix de l'antibiotique est réalisé de manière très empirique dans la plupart des infections banales débutantes : le médecin prescrit, en fonction de l'examen clinique, la molécule dont l'efficacité lui paraît la plus probable (antibiothérapie dite probabiliste). Ce n'est que dans les infections graves, récidivantes ou les échecs thérapeutiques que l'on fait appel au laboratoire qui réalisera une culture et un antibiogramme **[105].**

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne. Il donnera donc des indications sur l'efficacité *in vitro* de ces antibiotiques **[105].**

IV.5.3. Principe :

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Pétri **[105].**

IV.6. Les techniques d'antibiogramme :

IV.6.1. Techniques classiques :

IV.6.1.1. Méthodes de dilution :

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques **[105].**

IV.6.1.2. En milieu liquide :

L'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macro dilution) ou de cupules (méthode de micro dilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance n'est visible **[105] (figue 12).**

IV.6.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

CMI est la plus petite quantité d'antibiotique (ATB) capable d'inhiber une croissance visible à l'œil nu. La CMI d'un germe donné peut être mesurée par différents procédés de laboratoire Cette technique utilise des disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotique déposé à la surface d'une gélose spécifique coulée en boîte de pétri uniformément ensemencée d'une suspension (100 bactéries/mL) de la bactérie étudiée **(figure 12) [105].**

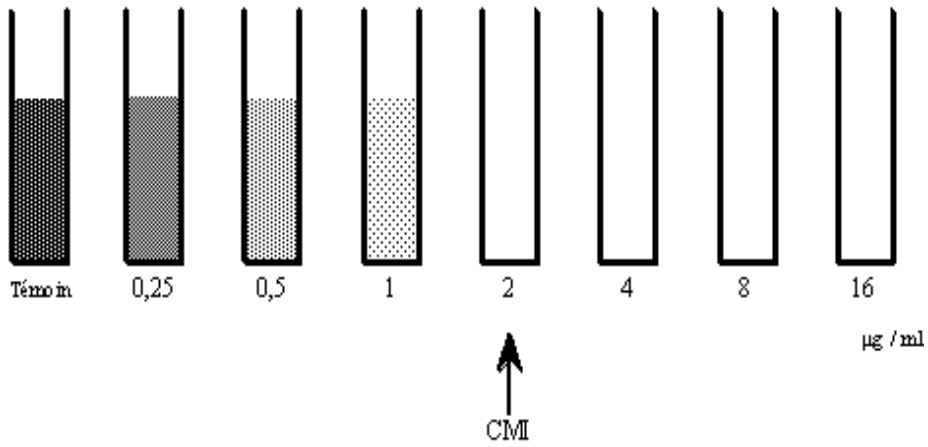


Figure 12 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide **[105].**

IV.6.3. Méthodes de diffusion (Antibiogramme standard) :

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est ensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton, éventuellement additionnée de sang. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits **[105] (Figure 13).**

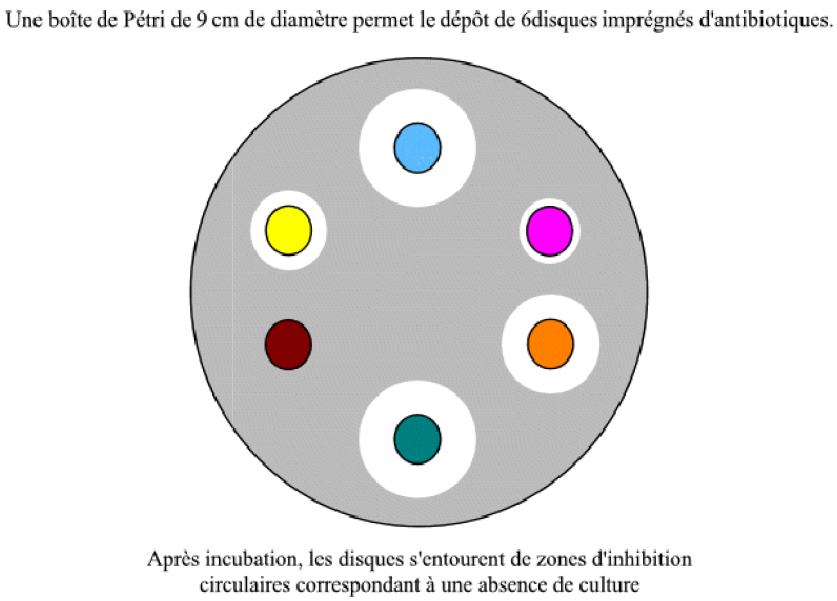


Figure 13 : Illustration d'un antibiogramme standard **[105].**

IV.6.3.1. La bactérie est sensible : à l'antibiotique quand la CMI est inférieure à la concentration critique inférieure. Concrètement, ceci signifie qu'il suffit d'une faible concentration d'antibiotique pour tuer les bactéries et que cette dose nécessaire est encore plus faible que la plus faible des doses qu'on peut administrer chez l'homme. Donc en clair, si on traite quelqu'un avec l'antibiotique, la concentration de celui-ci dans l'organisme sera toujours suffisante pour tuer les bactéries **[105].**

IV.6.3.2. La bactérie est résistante : à l'antibiotique quand la CMI est supérieure à la concentration critique supérieure. Concrètement, la dose nécessaire pour tuer les bactéries est bien trop élevée pour être supportée chez l'homme sans effets secondaires importants. Cet

antibiotique ne peut pas être utilisé pour traiter une infection **[105].**

IV.6.3.3. La bactérie est intermédiaire : à l'antibiotique quand la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques. En pratique, ça correspond à une situation où la concentration est tantôt suffisante pour tuer les bactéries, tantôt insuffisante. Il faut considérer que la bactérie sera résistante in vivo et il ne faut pas utiliser cet antibiotique. Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe **[105].**

IV.7. Les effets indésirables des antibiotiques :

IV.7.1. Les réactions allergiques :

Elles correspondent à une réaction exagérée de l'organisme contre la substance médicamenteuse qu'il identifie comme étrangère. Elles apparaissent souvent soudainement. Les réactions allergiques peuvent toucher tous les organes, notamment la peau. Elles se manifestent de différentes manières : démangeaisons, urticaire, éruption de boutons, et plus rarement, éruption bulleuse potentiellement grave (des cloques se forment, la peau se décolle…), œdème de Quincke et choc anaphylactique. La survenue d'une réaction allergique nécessite l'arrêt du traitement.

IV.7.2. Les troubles digestifs :

Les antibiotiques peuvent agir de deux façons sur le tube digestif : d'une part, certains d'entre eux ont un effet direct sur son fonctionnement, en provoquant des nausées, des vomissements ou des diarrhées. D'autre part, tous les antibiotiques perturbent la flore intestinale, qu'ils détruisent de manière plus ou moins accentuée. L'équilibre de cette flore étant modifié, la digestion et le fonctionnement de l'intestin sont perturbés. Cela peut provoquer des maux de ventre, des diarrhées ou des ballonnements. Les troubles digestifs peuvent apparaître immédiatement ou après quelques jours de traitement **(********)(8).**

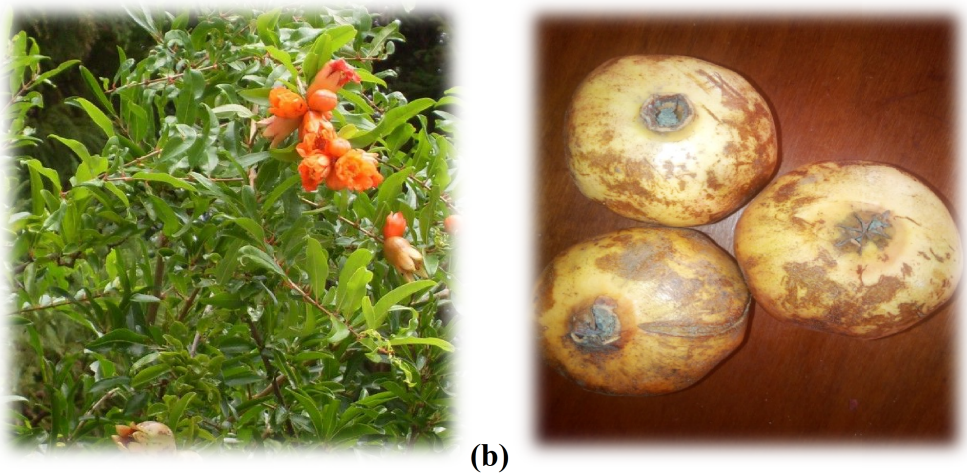
Matériels et Méthodes

V. Matériel et méthodes

V.1. Matériel :

V.1.1. Matériel végétal (cultivar de grenade) :

Les fruits que nous avons utilisés dans nos essais provenaient d'un lot de fruits du cultivar de grenade variété du *Punica granatum* maxima rubra (Récolte d'Octobre 2017, Mitidja) **(Figure 14)**. Sa qualité, en fait un produit demandé sur le marché national.



(a) **(b)**

Figure 14 : La variété du *punica granatum* maxima rubra, a : Arbre en période de floraison, b : Fruit de *P. granatum.*

Les principales caractéristiques de ce cultivar sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau II : Les principales caractéristiques culturales de la variété maxima rubra **(*********)(9).**

Entretien et plantation	Caractéristiques végétales	Botanique
-**Arrosage :** modéré en hiver, abondant en été. -**Zones climatiques France :** méditerranéen, océanique. -**Période de plantation :** Toute l'année (hors gel). -**Niveau de soin :** moyen. -**Exposition** : soleil.	-**Feuillage décoratif** : oui. -**Couleur fleur :** rouge orangé vif. -**Couleur feuille :** vert doré. -**Forme des fleurs :** doubles. -**Saison d'intérêt :** printemps, été, automne. -**Feuillage :** caduc.	-**Rusticité :** semi-rustique. -**Espèce** : *granatum.* -**Nom botanique** : *Punica granatum* maxima rubra. - **Famille :** Punicacées.

-**pH du sol** : neutre. -**Composition du sol** : normal, sec. -**Température minimale :** -5°C. -**Utilisation en jardin** : massif, haie, bord de mer, isolé, bac. -**Utilisation pour la maison** : terrasse, véranda.	-**Largeur à maturité** : 4m. -**Hauteur à maturité :** 1.8m-4m. -**Période de floraison :** mai à aout.	

V.1.2. Les micro-organismes : Les deux micro-organismes utilisés dans notre travail ont été prélevé précédemment a partir des prélèvements effectués dans des patients au niveau de laboratoire de microbiologie de Polyclinique de Médéa.

Tableau III : Les micro-organismes utilisés dans le test d'antagonisme.

Germe	Source (Lieu de prélèvement)	Pathogénicité	Date de prélèvement
Escherichia coli	Polyclinique de Médéa	+	18/02/2018
Staphylococcus aureus		+	18/02/2018

V.1.2.1. Vérification de la pureté des souches :

On prélève une colonie à l'aide d'une ance stérile, puis la déposer au périphérique de la gélose solide. Ensemencer la colonie à l'aide d'une ance de platine par stries dans des conditions de stérilité (dans la zone stérile).

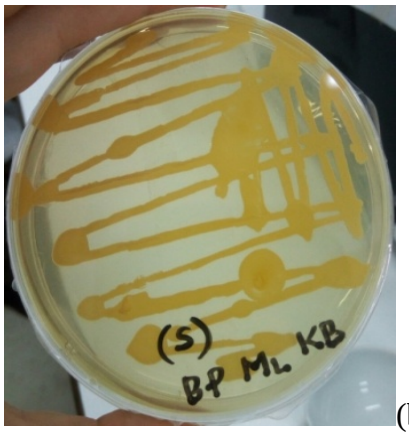
Ensuite les boites ont été incubé à une température de 37°C pendant 24h.

V.1.2.2. Identification des souches utilisées :

Prélever des colonies sur lesquelles isolées sont effectuées les examens suivants :

V.1.2.2.1. Examen macroscopiques :

Les caractéristiques macroscopiques sont obtenues à partir des cultures bactériennes sur milieu gélosé **(Figure 15)**, les caractères examinés sont représentés dans le **(Tableau IV).**

(a) 

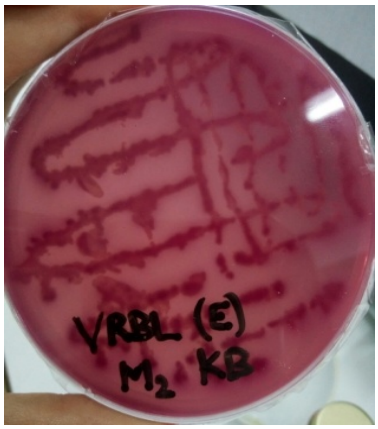
(b) 

Figure 15 : Observation macroscopique des colonies, **a** : *S. aureus* dans un milieu Baird-Parker (culture jeune < 24heures), **b** : *E. coli* dans un milieu VRBL (culture jeune < 24 heures).

Tableau IV : Les caractéristiques macroscopiques des colonies de deux bactéries.

Espèce bactérienne / **Critères morphologiques**	***Escherichia coli***	***Staphylococcus aureus***
La forme	Ronde	Ronde
Le relief	Plate	Plate
Le contour	à bord régulier	à bord régulier
Le diamètre	1 à 2 mm	2 à 3 mm
La taille	Petite colonie	Petite colonie
La surface	Lisse	Lisse
La couleur	Rouge	Jaune d'or opaque

V.1.2.2.2. Examen microscopique :

On prélève une colonie bien isolée sur laquelle on effectué une coloration de Gram et un état

frais. Une observation microscopique permet de noter le Gram, la taille, la forme et le mode d'association de chaque souche **(Tableau V)** et **(Figure 16).**

Tableau V: Les caractéristiques microscopiques de deux espèces bactériennes étudiées.

Espèce bactérienne **Critères microscopiques**	***Escherichia coli***	***Staphylococcus aureus***
Gram	Négative (-) Coloration rose	Positive (+) Coloration violet
Forme	Bacille	Coque
Mode d'association	Cellules séparées	Grappe de raisin

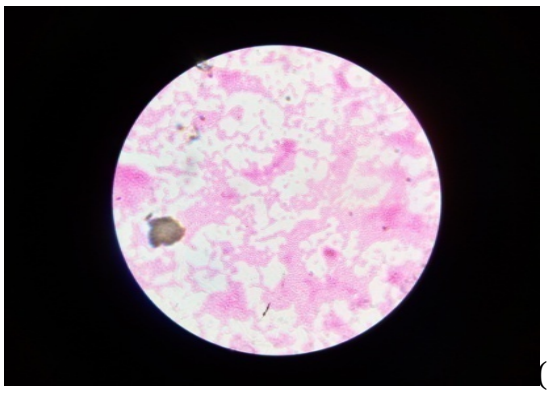
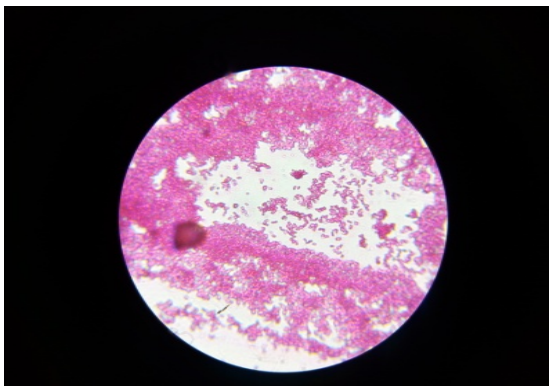
(a)  **(b)** 

Figure 16 : Observation microscopique des souches de *S. aureus* et *E. coli* (état frais), **a** : Cellules bactériennes de *S. aureus*, **b** : Cellules bactériennes de *E. coli.*

V.1.2.2.3. Test de catalase :

La catalase est mise en évidence par émulsion d'une colonie dans une goutte d'eau oxygéné à 10 volumes. La présence de la catalase est détectée par le dégagement de bulles d'air.

V.1.3. Les milieux de cultures et les réactifs utilisés :

Les milieux de cultures et les réactifs utilisés figurent en **(Annexe I).**

V.2. Méthodes :

V.2.1. Méthode appliquée à la matière végétale :

V.2.1.1. Méthode d'extraction des huiles essentielles par hydro-distillation :

V.2.1.1.1. Principe :

L'hydro-distillation est l'un des procédés les plus simples et le plus ancien appliqué pour l'extraction des huiles essentiels des plantes. Il repose sur le fait que la plupart des matières odorantes volatiles peuvent être entraînées à la vapeur d'eau pour être séparées ultérieurement. Actuellement, pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, les techniciens ont mis au point le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche **(Figure 17) [106].**

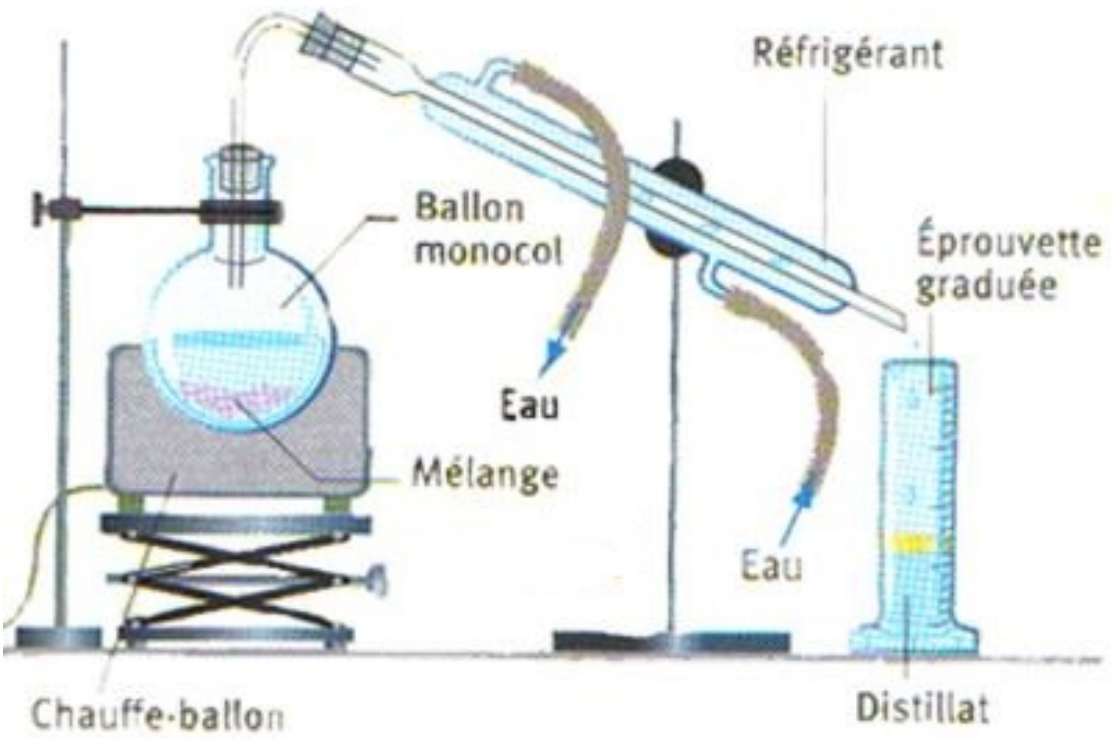
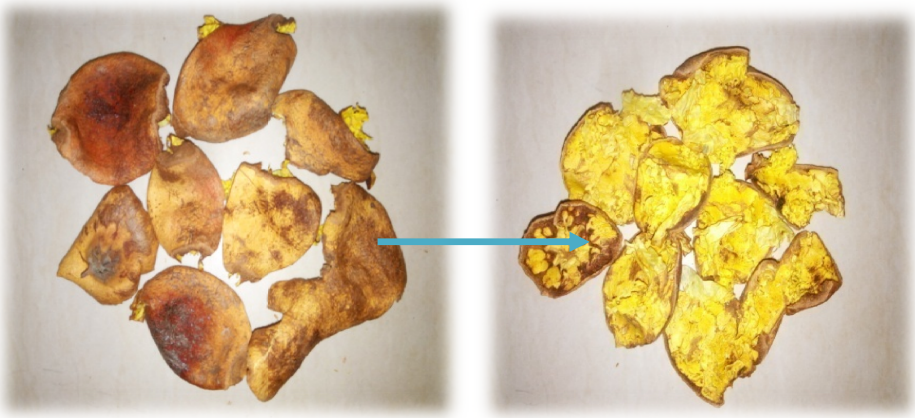


Figure 17 : Montage d'extraction par hydro-distillation.

V.2.1.1.2. Préparation de la poudre végétale :

Les pelles de grenade fraichement cueillies sont préalablement séchées à labrit de la chaleur et pesées **(Figure 18).**



a **b**

Figure 18 : Les pelles de fruit de grenade utilisées ; **a :** pelles fraiches ; **b :** pelles séches.

V.2.1.1.3. Macération :

Elles sont finement broyées et immergées dans l'eau contenue dans le ballon **(Figure 19).**



Figure 19 : Les pelles de grenade broyées puis émergés dans de l'eau distillée.

V.2.1.1.4. Distillation :

200g de matériel végétal frais (poudre) est introduite dans une litre d'eau dans un ballon de 2 litre. Après 24h de macération, le ballon est chauffé à l'aide d'un chauffe ballon, la vapeur d'eau générée se charge au contact de la plante des produits volatils qu'elle entraine avec elle, condensée dans le réfrigérant, elle est recueillie dans une ampoule à décanter où la phase aqueuse (inférieur) est éliminée pour ne conserver que la phase supérieur qui constitue l'huile essentielle.

V.2.1.1.5. Purification :

Pour éliminer toute trace d'eau, faire passer les différentes essences obtenues sur une centrifugeuse (2500 trs/min durant 5 minutes).

V.2.1.1.6. Conservation :

Finalement, l'huile essentielle doit être conservée dans des flacons en verre fumés bien bouchés et gardés au frais dans une température inférieure à 4°C **(Figure 20**).



Figure 20 : L'huile essentielle de pelle de grenade après purification.

V.2.1.2. Examens appliqués aux germes :

V.2.1.2.1. Test de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :

V.2.1.2.1.1. But :

Tester l'efficacité thérapeutique des huiles essentielles de la grenade sur les deux micro-organismes testés : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Cette étude pratique soit sur milieu solide ou en milieu liquide, mais la plus économique est celle sur milieu solide, qui permet de tester plusieurs souches bactériennes en même temps **[107]**.

Parmi les méthodes qui existent en microbiologie, la méthode de diffusion étant la plus utilisée a été choisie (antibiogramme). Elle repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien (ici les huiles essentielles) sur la cible (microorganisme) est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Ainsi, dans cette méthode il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester **[108]**.

V.2.2. Paramètres de l'activité antimicrobienne des HE :

L'étude de l'activité microbiologique des huiles essentielles obtenues débute par la détermination de l'indice d'inhibition (Ii).

V.2.2.1. Détermination l'indice d'inhibition (Ii) :

V.2.2.1.1. Dilution : On met 2 mL de l'extrait de grenade dans un tube à essai puis on réalise une dilution de 50%, ensuite on répète l'opération jusqu'à la cinquième dilution. La **Figure 21** et le **tableau VI** représentent les différentes étapes de la dilution de l'extrait de grenade. Ainsi, on prépare six solutions de concentration différentes **[106].**

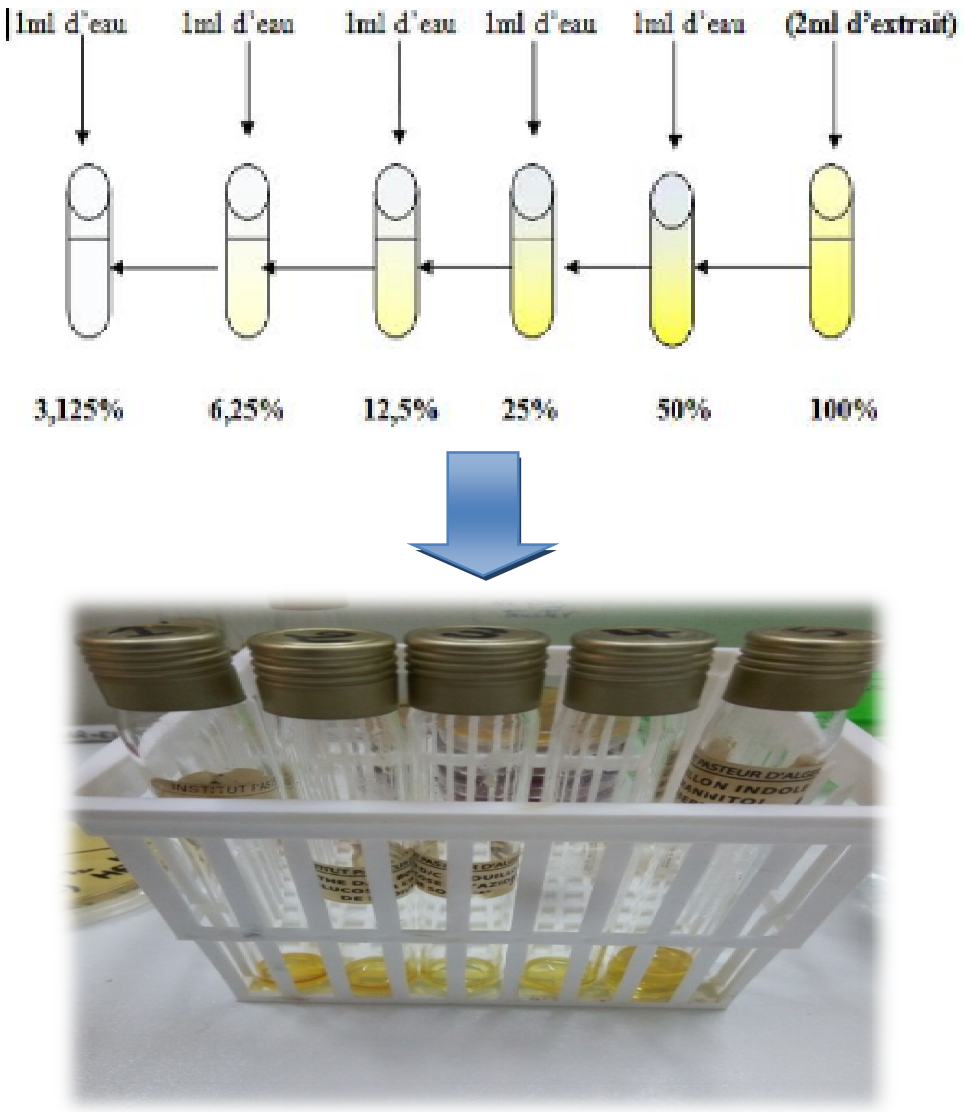


Figure 21 : Les dilutions des huiles essentielles de pelle de grenade.

Tableau VI : Les différentes concentrations de la dilution des huiles essentielles utilisées dans l'examen de l'activité antimicrobienne.

Concentration [C]	C1(0.5mg/mL)	C2	C3	C4	C5
V. HE	2mL	2mL [C1]	2mL [C2]	2mL [C3]	2mL [C5]
H_2O	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

V.2.2.1.2. Préparation de la suspension bactérienne : Les inoculums bactériens ont été produits. Les deux bactéries sélectionnées , ont été cultivées dans des milieux liquides, les cellules bactériennes ont été ensuite concentrées par centrifugation à 5000 trs pendant 15 min, agitées trois fois durant 30 secondes dans une solution physiologique stérile et mises en suspension dans 500 mL d'eau physiologique stérile **(Figure 22)**[**105]**.

Quantité d'inoculum utilisé:

Nous avons utilisé une concentration de 10^8 germes/mL d'inoculum pour chaque bactérie , en utilisant une numération spectrophotométrique directe à une DO=0.5.

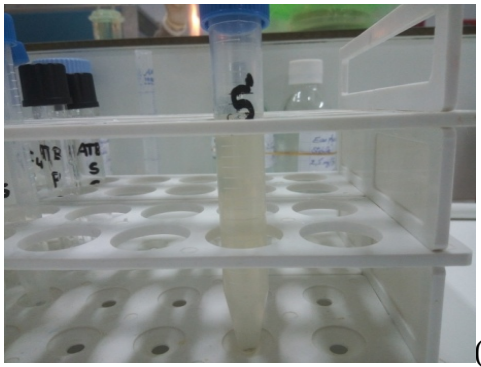
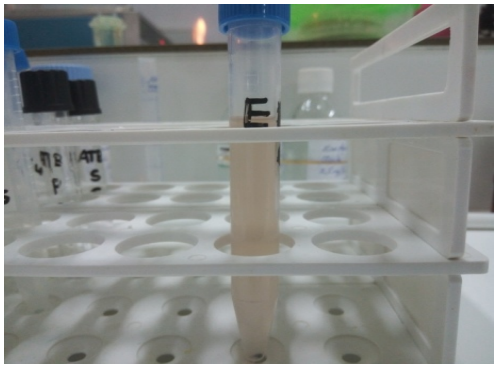
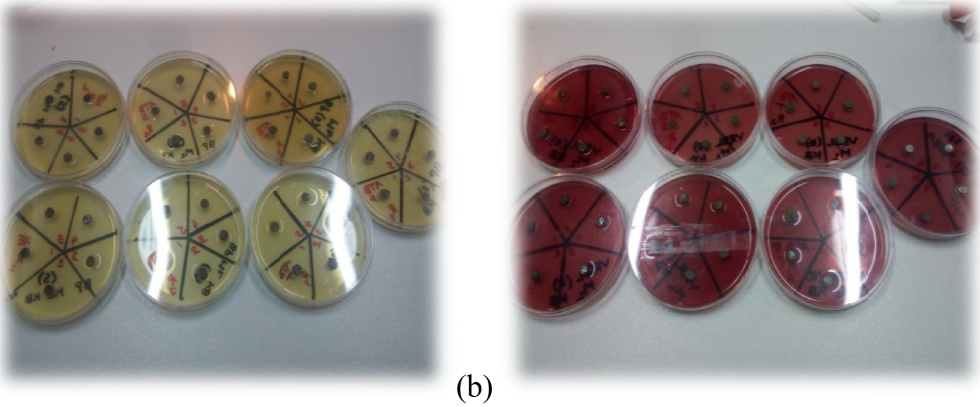
(a)  (b) 

Figure 22 : Suspension bactérienne de deux bactéries, a : La suspension bactérienne de la bactérie *S. aureus*, b : La suspension bactérienne de la bactérie *E. coli*.

V.2.2.1. 3. Application de la technique des disques :

A l'aide d'une pince stérile, on place les disques préalablement inoculés dans l'extrait de grenade sur les boites de pétri. On refait l'opération pour les cinq dilutions.

Les boites de Pétri sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24h pour les deux bactéries **(Figure 23)[105].**



(a) (b)

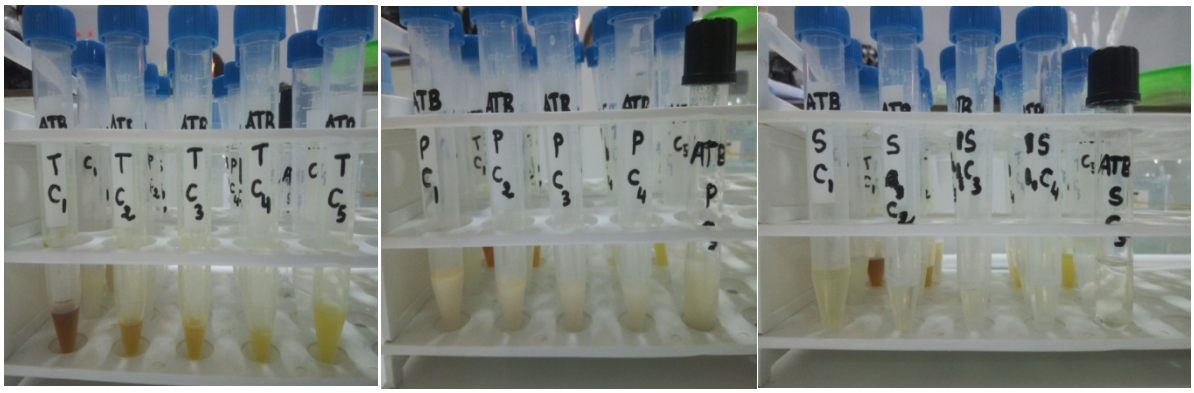
Figure 23 : Antibiogramme sur les deux bactéries, a : Antibiogramme sur la bactérie *S. aureus*, b : Antibiogramme sur la bactérie *E. coli*.

V.2.3. Antibiogramme :

L'antibiogramme est une analyse permettant de déterminer la sensibilité d'une bactérie à divers antibiotiques **[105].**

V.2.3.1. Préparation de la dilution des antibiotiques :

On met 2 mL d'antibiotique dans un tube à essai puis on réalise une dilution de 50%, ensuite on répète l'opération jusqu'à la cinquième dilution **(Figure 24).**



(a) **(b)** **(c)**

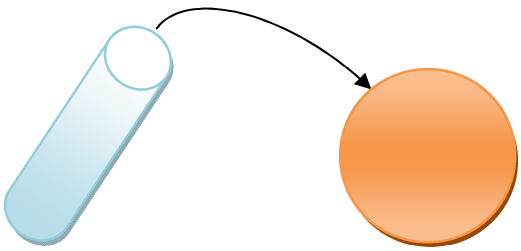
Figure 24 : les dilution des antibiotiques, **a** : Tétracycline, **b** : Pénicilline et **c** : Sulfamide utilisées dans l'examen de l'activité antimicrobienne.

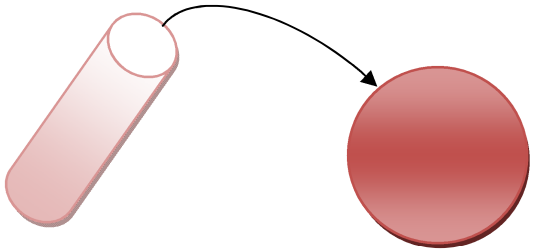
Tableau VII : Les différentes concentrations de la dilution des antibiotiques utilisées dans l'examen de l'activité antimicrobienne.

Antibiotiques	Concentrations [C]				
	C1 (0.5mg/mL)	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**
V. ATB (P)	2mL	2mL [C1]	2mL[C2]	2mL[C3]	2mL[C4]
H_2O	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
V. ATB (T)	2mL	2mL [C1]	2mL [C2]	2mL [C3]	2mL [C4]
H_2O	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
V. ATB (S)	2mL	2mL [C1]	2mL [C2]	2mL [C3]	2mL [C4]
H_2O	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

V.2.3.2. Application des disques :

On place les disques préalablement inoculés dans les antibiotiques sur les boites de pétri à l'aide d'une pince stérile. On refait l'opération pour les cinq dilutions **(Figure 25) [106].**



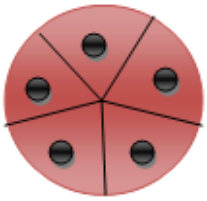


Suspension bactérienne de *S. aureus* avec une concentration de 10^8 germes/mL étalée sur milieu Baird-parker

Suspension bactérienne d' *E. coli* avec une concentration de 10^8 germes/mL étalée sur milieu VRBL



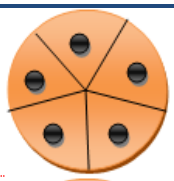
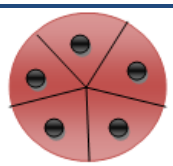
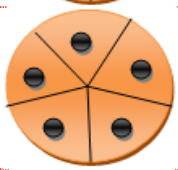
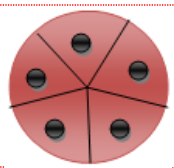
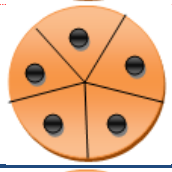
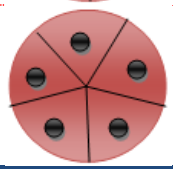
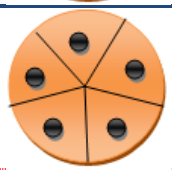
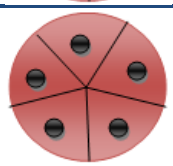
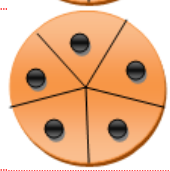
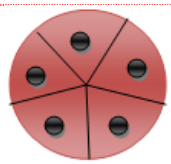
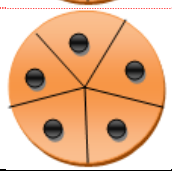
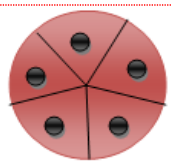
Milieu Baird-Parker

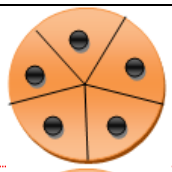
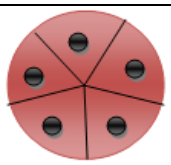
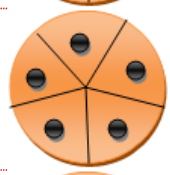
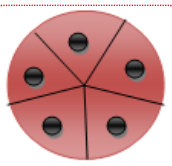
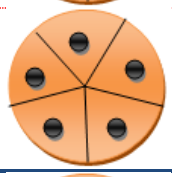
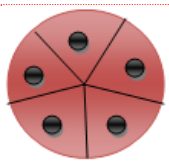
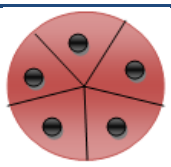
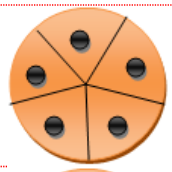
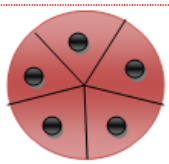
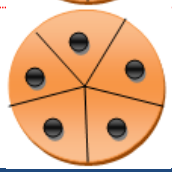
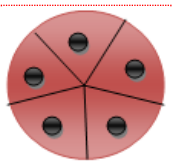


Milieu VRBL

Figure 25 : Application des disques

Tableau VIII : Dispositif expérimental représente le test *in vitro* de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des antibiotiques étudiés **(R : répétitions)**.

Traitement		Germe	
		S. aureus	E. coli
HE	R1		
	R2		
	R3		
ATB (P)	R1		
	R2		
	R3		

ATB (T)	**R1**		
	R2		
	R3		
ATB (S)	**R1**		
	R2		
	R3		

V.2.3.3. incubation :

Les boites de Pétri sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24h pour les deux bactéries **[106].**

V.2.3.4. Lecture :

Elle consiste à mesurer les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée, la formation d'un halo clair autour des disques est considérée comme indicateur de l'activité d'inhibition de la croissance bactérienne. L'indice de d'inhibition (Ii) est déterminé en utilisant la formule suivante **[109]**:

$$Ii\% = \frac{Diamètre\ halo\ (mm) - Diamètre\ disque(mm)}{Diamètre\ disque\ (mm)} X100$$

V.2.4. Traitement statistique des données :

Pour chaque série d'analyses, sont calculés la moyenne $(\overline{x})$ **,** l'écart type **(ε)**, l'intervalle de confiance (**IC**), la variance (**s^2), et** le degré de liberté **d.d.l**. .

La comparaison des moyennes s'applique par le "**test de Student",** la valeur de

« t calculé » est donnée par l'expression : $t = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 / \sqrt{s^2/N1 + s^2/N2}$.

Pour un d.d.l. de (N1+N2)-2 et à 5% d'erreur, la valeur de" **t table "**, nous donne le degré de signification (P) lu sur la table de Student (Annexe II).

Résultat
Et
Discussion

VI. Résultats et discussion :

VI.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des (HE)

Les huiles essentielles, connues également sous le nom d'huiles volatiles, sont des substances odorantes huileuses, volatiles, peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, incolores ou jaunâtres, inflammables qui s'altèrent facilement à l'air en se résinifiant **[110].**

Elles sont liquides à température ordinaire, quelques unes sont solides ou en partie cristallisées, elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes dont elles se distinguent par leur volatilité. Leur odeur plus ou moins forte, suave, piquante ou désagréable. Elles ont la propriété de ne pas laisser de tache durable sur le papier **[110].**

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par **[111].**

De nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes **[111].** Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre **[111].**

Avant la mise en œuvre d'une stratégie de lutte contre les bactéries pathogènes à l'aide de substances biologiques, il est nécessaire de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interactions avec le pathogène **[112].**

C'est pourquoi un test d'activité antagoniste entre HE et les deux bactéries pour la détermination de l'effet antibactérien.

La méthode que nous avons utilisée est celle de diffusion sur un milieu gélosé par la mesure de l'indice d'inhibition de la zone de croissance bactérienne. Les résultats obtenus pour les différentes concentrations de l'extrait HE sont présentés sur la **figure 26** et le **Tableau IX**.

Au bout de 2 jours d'incubation sur un milieu solide une action inhibitrice exercée par l'extrait vis-à-vis de la croissance bactérienne de *S. aureus* et *E. coli* a été observée.

Le taux d'inhibition de *S. aureus* (Ii) enregistré a été de 70.58 ± 0.9 % avec la concentration C1, en présence de la même concentration (Ii) pour *E. coli* est de 58.33 ± 0.9 %, l'analyse

statistique a montré que le traitement de *S. aureus* par HE a été très significatif par rapport au traitement d'*E. coli* au seuil de 5%.

Selon les résultats obtenus, on observe que l'activité antibactérienne de la concentration C5 des huiles essentielles sur la bactérie *E. coli* est plus significative 58.33 ± 0.9 % que celle de la bactérie *S. aureus*.

Sur milieu gélosé, nos résultats rejoignent ceux obtenus par **[113], [114],** bien que les milieux et/ou les micro-organismes testés soient différents.
En effet, **[114]** en réalisant un travail qui consiste à rechercher l'effet antagoniste des huiles essentielles des fleurs de *Lavandula officinalis* et les feuilles de *Laurus nobilis* à l'égard de *Staphyloccocus aureus* ATCC25923 a observé des taux considérables de réduction de la croissance de la bactérie *Staphyloccocus aureus* ATCC25923 par rapport au *Escherichia coli* ATCC25921 et *Pseudomonas aeroginosa* ATCC29733 qui ont enregistré des faibles taux d'inhibition.

Les résultats trouvés par **[115]** montrent que l'activité inhibitrice des germes commence à partir de 0,12mg/ml d'extrait, les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration en extrait. Les diamètres des zones d'inhibitions varient de 2,40 ± 0,05 mm à 21,00±0,40 mm.

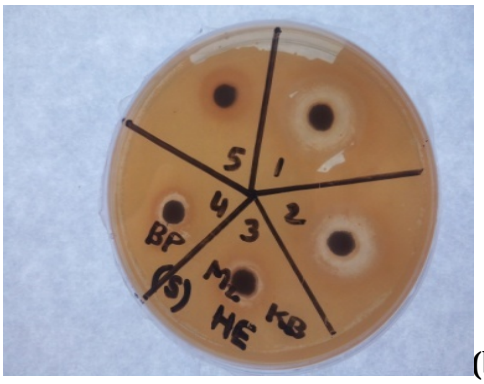
D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'extrait aqueux de *Punica granatum* a un effet antibactérien sur les bactéries et les moisissures testées, les bactéries Gram+ (*S. aureus, Listeria monocytogenes*) sont les plus susceptibles par comparaison avec les bactéries Gram- (*E.coli*); ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram- **[115].**

Ces résultats corroborent ceux de **[116],** qui ont démontré que des extraits de grenade présentent une activité antibactérienne significative contre *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *S.aureus*, ceux de **[117],** qui a montré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*, et ceux de **[118]** qui ont étudié l'effet *in vivo* et *in vitro* de l'application de diverses concentrations d'extraits d'écorce de grenade pour inhiber la croissance de la Salmonelle, en constatant que la dose minimale était de 62,5 mg/l.
Cette activité antibactérienne de cet extrait est due, au moins partiellement, à la présence des

polyphénols. Cela est confirmé par d'autres recherches qui ont attribué l'activité antimicrobienne à la présence des polyphénols.

Il apparaît que les souches de *S. aureus*, *L. monocytogenes* et des bactéries lactiques (G+) sont les plus susceptibles par comparaison avec les souches de *E. coli* (G-); ceci peut être expliqué par la différence de la structure de la paroi entre les bactéries gram positives et les bactéries (G-) **[119].**

Globalement, nos extraits sont des mélanges riches en phénols simples et polyphénols, on peut dire alors que l'activité antibactérienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence des polyphénols, cela est confirmé par l'étude de **[120]** qui a attribué l'activité antibactérienne à la présence des polyphenols.

(a) 

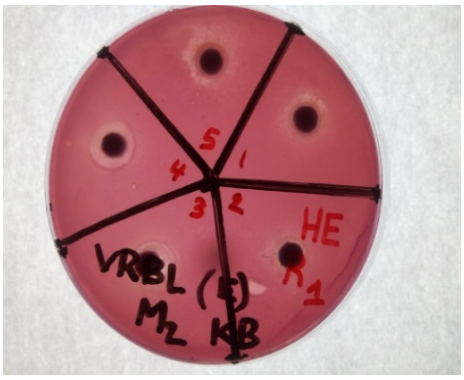
(b) 

Figure 26 : Effet antibactérien des huiles essentielles de pelle de grenade sur les bactéries de : **(a)** *S. aureus* et **(b)** *E. coli*.

Tableau IX : Résultats de l'activité antibactérienne (Ii) des huiles essentielles de pelle de grenade sur les bactéries testées *S. aureus* et *E. coli* après 48heures d'incubation.
Les moyennes sont calculées à partir de cinq répétitions et les intervalles de confiance sont donnés à 95% (au seuil de 5%).

Concentration HE	Ii (%) *S. aureus*	Ii (%) *E. coli*
C1	70.58 ± 0.9	58.33 ± 0.9
C2	66.66 ± 1.27	58.33 ± 0.9
C3	58.33 ± 0.5	58.33 ± 0.9
C4	50 ± 1.10	58.33 ± 0.9
C5	37.5 ± 0.63	58.33 ± 0.9

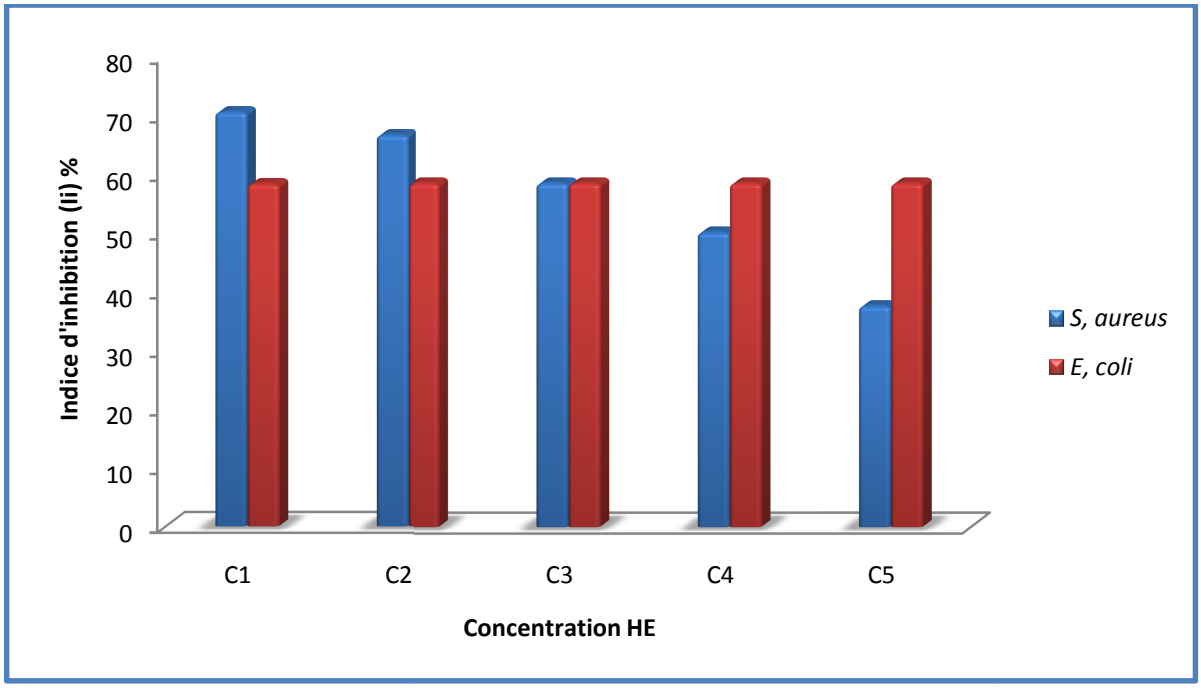


Figure 27 : Histogramme de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de pelle de grenade sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli* (Excel 2007).

VI.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques (ATB)

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe **[121].**

Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifier, se fixe sur une cible et perturber la physiologie bactérienne **[121].**

Les antibiotiques agissent en général de façons très spécifiques sur certaines structures de la cellule bactérienne, cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés **[121].**

Les tests antibactériens ont pour but de rechercher l'activité de chaque antibiotique : Pénicilline, Sulfamide et Tétracycline vis-à-vis de différents micro-organismes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Ce test consiste en l'application des disques imprégnés d'antibiotiques sur une gélose préalablement ensemencée par des bactéries. L'antibiotique va diffuser dans la gélose avec une concentration décroissante.

Dans la zone où la concentration est inhibitrice, on n'observera pas de croissance bactérienne. Avec la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, on pourra classer la bactérie en sensible (S) ou résistante (R). L'analyse de l'efficacité de différents antibiotiques sur une souche bactérienne donne un antibiogramme.

La Figure ci-dessous montre l'apparition d'une zone d'inhibition suivie d'un arrêt de croissance de la bactérie selon le type d'antibiotique testé **(Figure 28).**

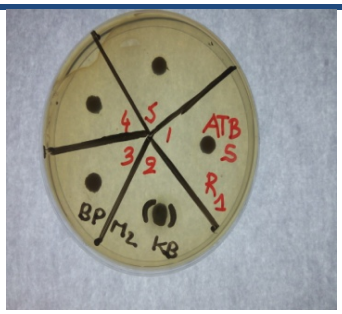
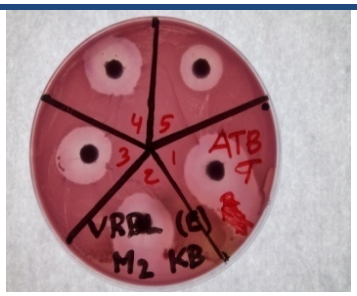
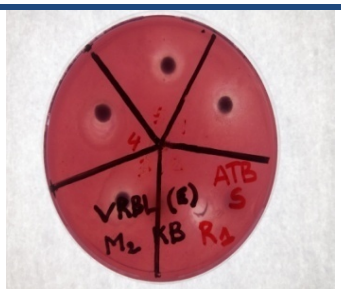
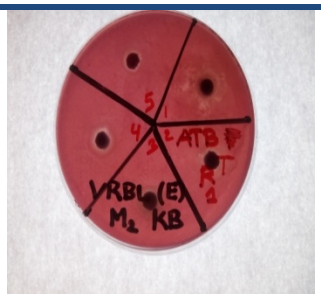
Germes	**Traitement d'ATB**		
	Pénicilline	**Sulfamide**	**Tétracycline**
S. aureus			
E. coli			

Figure 28: Antibiogramme de *S. aureus* et et *E. coli*.

VI.2.1.Test du traitement de Pénicilline :

C'est à Flemming que l'on attribue la découverte des antibiotiques de la famille des β-lacatmines en 1928. Ce dernier fut le premier à rapporter l'activité antibactérienne de la moisissure *Pénicillium* sur des colonies de staphylocoque. Il nomma la substance responsable de cette activité, pénicilline **[122].**

Devant l'impossibilité de purifier cette molécule, l'intérêt la pénicilline comme agent antibactérien fut mitigé jusqu'en 1940, année où un groupe de recherche anglais dirigé par Florey et Chain observèrent l'efficacité de la pénicilline contre les infections à streptocoque chez les souris suite à une injection sous-cutanée de l'antibiotique **[123].**

La pénicilline inhibe la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne en se fixant de façon covalente sur certaines enzymes responsables de la trans-peptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane, les empêchant ainsi d'assurer leurs fonctions **[124].**

Ces enzymes sont situées sur la face externe de la membrane interne et sont nommées protéines liant les pénicillines ou PLP **[125].** Les PLP sont présentes en quantité variable (de 3 à plus de 8) selon les espèces bactériennes et présentent des affinités différentes pour chaque famille de β-lactamines **[126].**

L'étude de l'effet inhibitrice de la pénicilline sur les deux espèces bactériennes *S. aureus* et *E. coli* a permis de montrer que Ii= 79.16 ± 0.96 % reste stable avec les cinq concentrations appliquées **C1, C2, C3, C4 et C5**, qui sont actives sur les isolats étudiés. Le plus fort pouvoir inhibiteur a été attribué à la souche *S. aureus* **(Figure 29 et Tableau X)**.

Tableau X : Les différentes moyennes de (Ii) obtenues de l'activité antimicrobienne du traitement Pénicilline sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli*. Les moyennes sont calculées à partir de cinq répétitions et les intervalles de confiance sont donnés à 95% (au seuil de 5%).

Concentration ATB	Ii (%) *S. aureus*	Ii (%) *E. coli*
C1	79.16 ± 0.96	77.27 ± 0.9
C2	79.16 ± 0.96	75 ± 0.63
C3	79.16 ± 0.96	72.22 ± 1.34
C4	79.16 ± 0.96	72.22 ± 0.9
C5	79.16 ± 0.96	64.28 ± 0.9

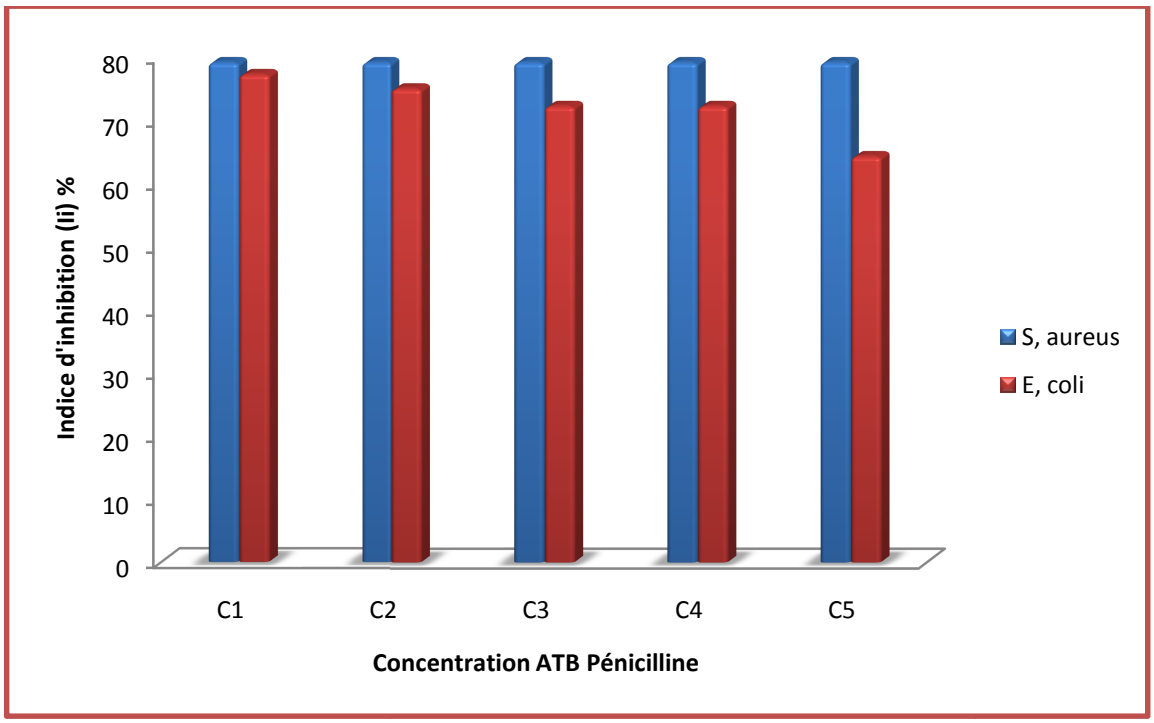


Figure 29 : Histogramme de l'activité antibactérienne de l'antibiotique Pénicilline sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli* (Excel 2007).

VI.2.2. Test du traitement de Tétracycline :

Les tétracyclines sont des traitements antibiotiques et antiparasitaires. Les tétracyclines sont plus précisément des bactériostatiques. Cela signifie qu'elles stoppent la multiplication des bactéries mais qu'elles ne détruisent pas celles déjà présentes à la différence des bactéricides. Les cyclines peuvent empêcher la prolifération d'une grande variété de bactéries, d'où leur utilisation dans le traitement de pathologies très différentes **(**********)(10).**

Les tétracyclines pénètrent à l'intérieur des cellules. Elles inhibent la synthèse des protéines bactériennes.

La prise de tétracyclines peut provoquer des troubles digestifs. De plus, ces antibiotiques sont susceptibles d'entraîner une coloration jaunâtre des dents définitives lorsqu'ils sont prescrits à un enfant de moins de 8 ans. L'exposition au soleil est également déconseillée pendant le traitement, car il existe un risque de photosensibilisation cutanée. La prise de tétracyclines est également contrindiquée aux femmes enceintes car ils franchissent la barrière placentaire et peuvent donc affecter l'enfant à naître. Un dernier point : certaines cyclines comme les tétracyclines, peuvent diminuer l'efficacité des contraceptifs oraux **(**********)(11).**

Selon les mêmes méthodes, des tests de l'activité antibactérienne des antibiotiques ont été effectuées sur les deux bactéries *S. aureus* et *E. coli* et pour déterminer la sensibilité de ces

bactéries sur l'antibiotique, les résultats obtenues dans le **Tableau XI** et la **Figure 30** montrent que l'activité antibactérienne des différentes concentrations de l'antibiotique Tétracycline sur la bactérie *S. aureus* est toujours plus forte que celle de la bactérie *E. coli*. La valeur la plus significative a été trouvé 61.03 ± 2.14 % avec *S. aureus* qui est sensible (S) au ATB.

Tableau XI : Les différentes (Ii) moyennes obtenues de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Tétracycline sur les bactéries de *S. aureus* et *E. coli*.

Les moyennes sont calculées à partir de cinq répétitions et les intervalles de confiance sont donnés à 95% (au seuil de 5%).

Concentration ATB	Ii (%) *S. aureus*	Ii (%) *E. coli*
C1	61.03 ± 2.14	46.29 ± 1.61
C2	55.80 ± 1.33	46.29 ± 1.61
C3	53.02 ± 1.46	46.29 ± 1.61
C4	45.83 ± 2.42	46.29 ± 1.61
C5	35.71 ± 3.17	46.29 ± 1.61

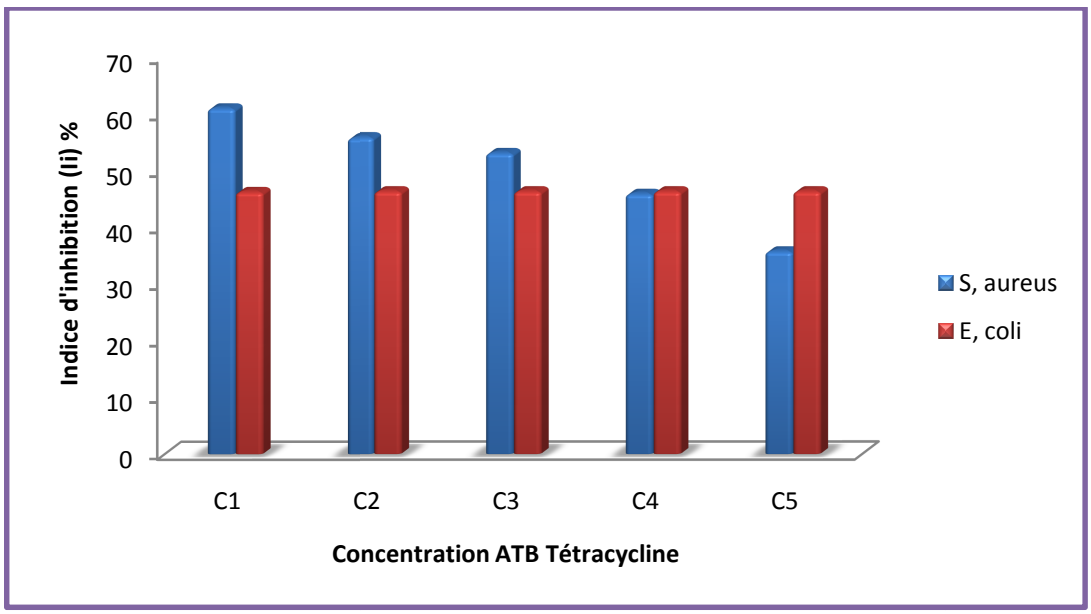


Figure 30 : Histogramme de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Tétracycline sur les bactéries de *S. aureus* et *E. coli* (Excel 2007).

VI.2.3.Test du traitement de Sulfamide :

Les sulfamides sont des seuls antibiotiques bactériostatiques. La première utilisation clinique des sulfamides remonte à 1935, La découverte de leur mécanisme d'action marquera le départ d'un large programme de recherche. Le spectre d'action extrêmement large des sulfamides a fait leur succès initial mais aujourd'hui, les résistances acquises aussi bien de nature chromosomique que plasmidique touchent avec une grande fréquence l'ensemble du spectre des sulfamides. Les sulfamides bloquent les voies métaboliques et inhibent la production d'ADN, d'ARN et de protéines **(**********)(12).**

Selon les résultats trouvés, les valeurs représentées dans le **Tableau XII** et **la Figure 31**, on observe que l'activité antibactérienne de toutes les concentrations C1, C2, C3, C4 et C5 de Sulfamide sur les deux bactéries est presque similaire, et que l'effet inhibitrice moyenne (Ii) est moyennement faible, il se situe entre (42.85 ± 3.17 et 44.44 ± 1.08) % cette moyenne reste toujours non significatif au seuil de 5%.

Tableau XII : Les différentes (Ii) moyennes obtenues de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Sulfamide sur les bactéries de *S. aureus* et *E. coli.* Les moyennes sont calculées à partir de cinq répétitions et les intervalles de confiance sont donnés à 95% (au seuil de 5%).

Concentration ATB	Ii (%) *S. aureus*	Ii (%) *E. coli*
C1	42.85 ± 3.17	44.44 ± 1.08
C2	42.85 ± 3.17	44.44 ± 1.08
C3	42.85 ± 3.17	44.44 ± 1.08
C4	42.85 ± 3.17	44.44 ± 1.08
C5	42.85 ± 3.17	44.44 ± 1.08

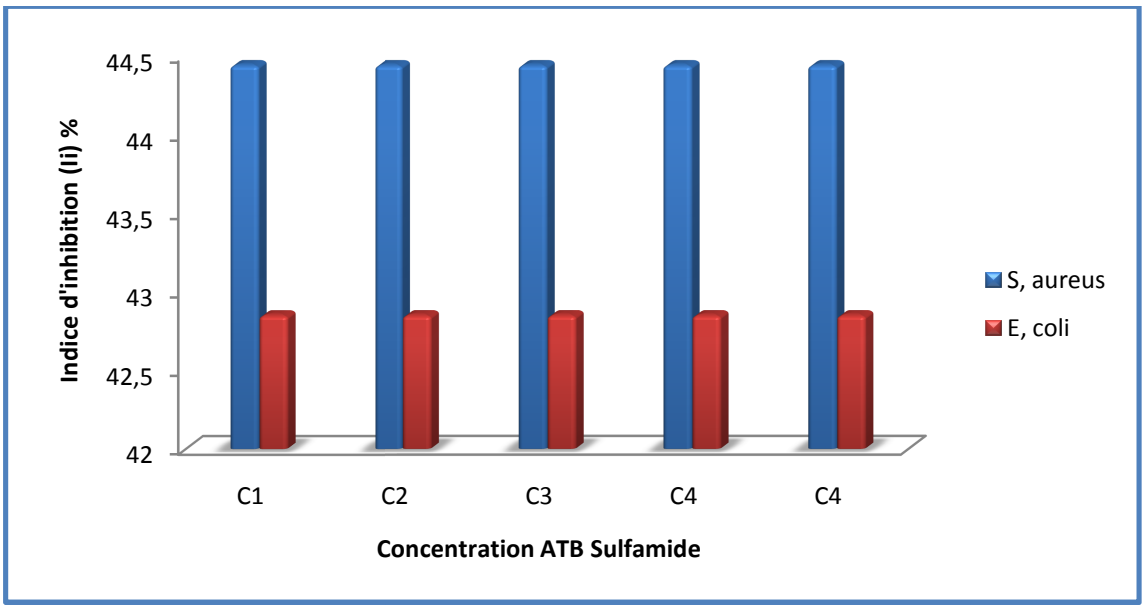


Figure 31 : Histogramme de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique Sulfamide sur les bactéries de *S. aureus* et *E. coli* (Excel 2007).

VI.3. Effet antibactérien des différents traitements :

En vue de connaître si l'effet antibactérien des différents traitements HE et ATB, autrement dit si les substances antibactériennes sont inhibitrice, nous avons jugé leur efficacité sur chacune des deux souches pathogènes.

VI.3.1. Effet des deux traitements HE et ATB sur *S. aureus* :

Les tests comparatifs des traitements d'antagonisme *in vitro* par l'utilisation des HE et des ATB à l'égard de *S. aureus* a permet de constater que cette souche bactérienne est fortement sensible aux fortes concentrations (C1) d'HE et de la pénicilline**.**

En recherchant de nouvelle potentialité des HE pour l'effet antibactérien, les valeurs moyennes de (Ii) a montré que ces essais ont révélé une inhibition de croissance bactérienne du pathogène testé, avec des pourcentages proches, qui varient de 70.58 ± 0.9 % avec HE et 79.16 ± 0.96 % par la pénicilline **(Tableau XIII et figure 32).**

Tableau XIII : Les différentes moyennes de (Ii) obtenues de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pelle de grenade et les antibiotiques sur la bactérie *S. aureus*.

[C]	Comparaison de l'effet des traitements HE et ATB vis à vis de *S. aureus*						
	HE	ATB (P)	HE/ATB (P)	ATB (T)	HE/ATB (T)	ATB (S)	HE/ATB (S)
C1	70.58 ± 0.9	79.16 ± 0.96	S/S	61.03 ± 2.14	S/NS	42.85 ± 3.17	S/NS
C2	66.66 ± 1.27	79.16 ± 0.96	S/S	55.8 ± 1.33	S/NS	42.85 ± 3.17	S/NS
C3	58.33 ± 0.5	79.16 ± 0.96	NS/S	53.02 ± 1.46	S/NS	42.85 ± 3.17	S/NS
C4	50 ± 1.1	79.16 ± 0.96	NS/S	45.83 ± 2.42	S/NS	42.85 ± 3.17	S/NS
C5	37.5 ± 0.63	79.16 ± 0.96	NS/S	35.71 ± 3.17	NS/NS	42.85 ± 3.17	NS/S

S : Significatif au seuil de $P < 0.05$

NS : Non significatif au seuil de $P < 0.05$

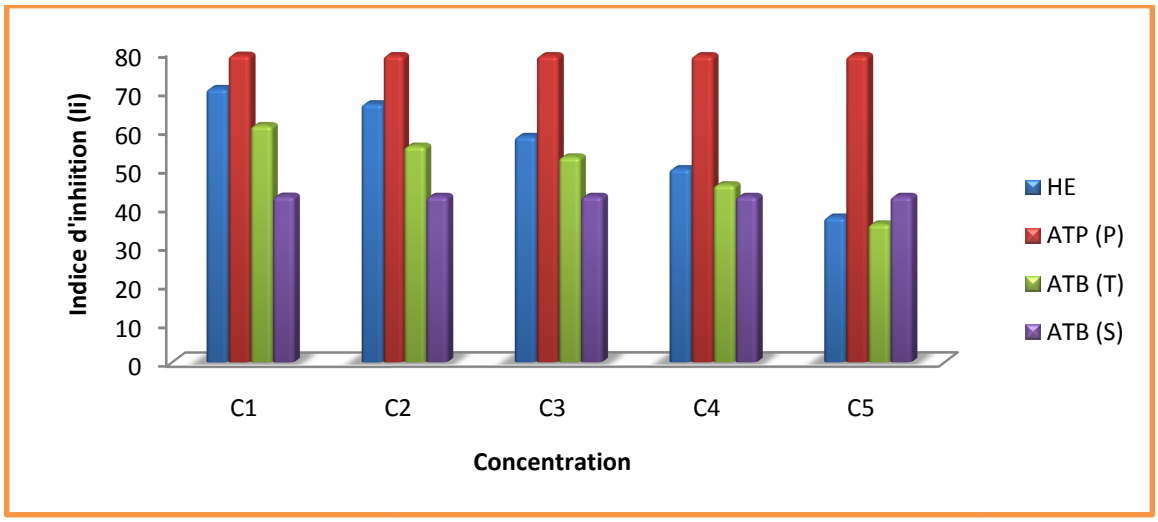


Figure 32: Histogramme de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pelle de grenade et les antibiotiques sur la bactérie *S. aureus* (Excel 2007).

VI.3.2. Effet des deux traitements HE et ATB sur *E. coli* :

Des valeurs proches de l'indice d'inhibition des HE et de la pénicilline ont été enregistré respectivement 58.33 ± 0.9 % et 77.27 ± 0.9 % par *E. coli* qui expliqué par un fort pouvoir inhibiteur exercé par les deux métabolites vis-à-vis de cette souche cible, par contre que le taux d'inhibition est moyennement faible avec les deux traitements ATB (tétracycline et sulfamide) **(Tableau XIV et figure 33).**

En ce qui concerne le diamètre de la zone d'inhibition, **[127]** considère que lorsqu'il est supérieur ou égal à **1 cm**, la substance est très inhibitrice de la cible, lorsqu'il est compris entre **0,5 cm** et **1 cm**, la substance est faiblement inhibitrice et quand aucune zone d'inhibition n'apparaît, la substance est sans aucun effet sur le germe testé.

Dans ce travail, le diamètre de la zone d'inhibition a toujours été supérieur à 1 cm pour les deux traitements HE et pénicilline.

Ce résultat va dans le même sens de celui trouvé par **[128]** et **[129].** En effet, l'huile essentielle de *P. aromaticus* a montré un important effet inhibiteur par rapport au antibiotiques contre les micro-organismes étudiés. Toutes les souches microbiennes ont été inhibées à la concentration de 1/500 v/v. Les micro-organismes les plus sensibles à cette huile essentielle étaient *Micrococcus luteus* et *Penicillium digitatum* dont la croissance a été arrêtée à la faible concentration de 1/1000 v/v. Suite à ces résultats, l'huile essentielle de *P. aromaticus* de l'Ile de la Grande Comore a manifesté des caractéristiques antibactériennes et antifongiques très intéressantes sur les micro-organismes testés. Ceci est en accord avec les investigations de plusieurs auteurs qui ont montré que l'essence de *Plectranthus aromaticus* inhibe le développement de *Staphylococcus aureus* et qu'elle a un excellent pouvoir antimicrobien. Ainsi que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de plusieurs plantes aromatiques et médicinales ont été attribuées à leur profil chimique et surtout aux alcools terpéniques **[130] ;[131] ;[132] ;[133] ;[134] ;[135] ;[136] ;[137] et [138].**

De même, **[139] ;[140] ;[141] ;[142] ;[143] ;[144] ;[145]** ont montré une action antimicrobienne de l'huile essentielle de *P. aromaticus* originaire de Bouèni s'explique par sa richesse et l'effet synergique entre les alcools terpéniques et les phénols dont le taux global est d'environ 62 %. Sachant que nos extrait utilisé dans le test antibactérien est un mélange non pure qui signifié que les interactions synergiques entre les différents composés peuvent

être l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires.

En outre, le fort pouvoir inhibiteur de cette huile contre les micro-organismes est dû essentiellement à ces principaux constituants, le trans-verbenol (23 %), le carvacrol (22,05 %) et le 1,4-cinéol (14,33 %). Plusieurs travaux ont montré que ces trois composés sont dotés d'un grand pouvoir antibactérien et antifongique **[146] ;[147] ;[148] ;[149] et [150].** En plus, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *P. aromaticus* peut être attribuée au phénomène de synergie entre tous les constituants volatils. Selon plusieurs études : **[151] ;[152] ;[153] ;[154] ;[155] ;[156] et [157].**

Tableau XIV : Les différentes moyennes de (Ii) obtenues de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pelle de grenade et les antibiotiques sur la bactérie *E. coli*.

[C]	Comparaison de l'effet des traitements HE et ATB vis à vis *d'E. coli*						
	HE	ATB (P)	HE/ATB (P)	ATB (T)	HE/ATB (T)	ATB (S)	HE/ATB (S)
C1	58.33 ± 0.9	77.27 ± 0.9	S/S	46.29 ± 1.61	S/NS	44.44 ± 1.08	S/NS
C2	58.33 ± 0.9	75 ± 0.63	S/S	46.29 ± 1.61	S/NS	44.44 ± 1.08	S/NS
C3	58.33 ± 0.9	72.22 ± 1.34	S/S	46.29 ± 1.61	S/NS	44.44 ± 1.08	S/NS
C4	58.33 ± 0.9	72.22 ± 0.9	S/S	46.29 ± 1.61	S/NS	44.44 ± 1.08	S/NS
C5	58.33 ± 0.9	64.28 ± 0.9	S/S	46.29 ± 1.61	S/NS	44.44 ± 1.08	S/NS

S : Significatif au seuil de $P < 0.05$

NS : Non significatif au seuil de $P < 0.05$

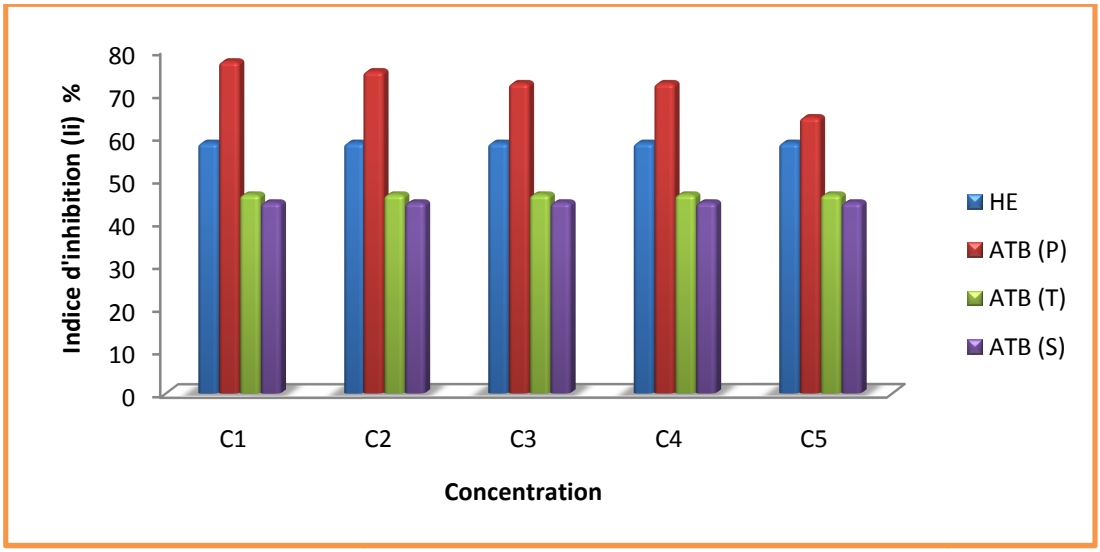


Figure 33 : Histogramme de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de pelle de grenade et les antibiotiques sur la bactérie *E. coli* (Excel 2007).

Le faible impact des deux antibiotiques Tétracycline et Sulfamide sur les deux germes testées peut être due a une forte résistance (R) de ces micro-organismes contre les deux substances, plusieurs auteurs **[158] ; [159] ;[160] et [161],** ont mis en évidence une forte proportion *d'E. coli* essentiellement multirésistants aux antibiotiques présents dans la flore intestinale des volailles. Cette multirésistance concerne d'ailleurs les anti-infectieux utilisés en élevage depuis de nombreuses années : la streptomycine, la tétracycline et les sulfamides. Des résistances au chloramphénicol, à la kanamycine, à la néomycine et à l'ampicilline sont moins fréquentes et généralement associées aux résistances plus anciennes **[162] ;[163] ; [164] et [165].**

● A la lumière des résultats récapitulés dans les Tableaux XIII, XIV et les figures 32, 33, nous pouvons conclure que le traitement antibactérien des deux bactéries pathogènes *in vitro* par les huiles essentielles de pelle de grenade *Punica granatum* a donné davantage de vigueur par rapport aux autres traitements d'antibiotique, ce qui nous a amené à utiliser la première stratégie pour lutter et limiter la pathogénicité des deux germes étudiés.

Conclusion

Conclusion et Perspectives:

Considérés comme une des révolutions médicales du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont apporté un immense bénéfice à l'humanité, en permettant de soigner de nombreuses infections bactériennes, et en faisant diminuer considérablement la mortalité qui y était associée. Malheureusement, l'utilisation de ces molécules a rapidement été suivie par l'apparition d'une résistance bactérienne aux traitements. Ponctuelles au départ, ces résistances représentent maintenant une menace mondiale croissante de la santé publique. De plus en plus de souches bactériennes deviennent multi-résistantes, et placent alors les soignants dans une situation d'impasse thérapeutique. Ce phénomène serait responsable de plusieurs dizaines de milliers de morts par an en monde. Couplé au manque du développement de nouveaux antibiotiques, le risque que l'absence de solutions thérapeutiques face à une infection bactérienne puisse devenir une constante grandit de jour en jour. Il est donc devenu nécessaire de mettre en place des moyens afin de minimiser cette problématique. L'étude de l'extraction des huiles essentielles à partir des pelles de grenade cultivée à la région de Mitidja a fait l'objet de ce projet de fin d'étude réalisé au niveau du laboratoire de biologie au sein de l'université de Médéa.
Le travail présenté porte sur l'effet antibactérien des huiles essentielles et trois types des antibiotiques sur deux micro-organismes pathogènes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Les HEs du pelle de grenade a été choisi car c'est un extrait d'une plante la plus cultivée et demandée au monde et plus particulièrement en Algérie, où elle représente à la fois un enjeu économique et sanitaire important et un terrain d'étude remarquable. Ce travail de recherche apporte des données nouvelles sur l'effet que peut avoir le traitement des bactéries pathogènes dans un milieu solide sur le taux d'inhibition de la croissance de ces germes.

L'activité antimicrobienne des différentes substances fait l'objet de ce travail. Les tests de diffusion en phase solide ont montré que l'extrait de l'écorce de fruit de grenade a un remarquable effet antibactérien sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Ainsi, l'extrait de grenade se révèle un effet très actif vis-à-vis de deux germes étudiés.

Les extraits de grenade désignés par « actifs » pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle de ce fruit dont ils sont extraits et permettraient, à partir du présent travail, d'ouvrir d'autres pistes à la recherche. Néanmoins, Une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour pouvoir évaluer avec précision l'activité antimicrobienne de chaque composé, et d'explorer d'autres activités thérapeutiques de ce fruit.

De ce fait, les perspectives envisagées pour cette étude sont les suivantes:

1) Caractérisation des molécules impliquées dans les effets antibactériens observés des HEs qui inhibent la croissance des pathogènes à l'aide d'outils moléculaires (méthodes de séparation biochimiques) tel que les techniques : HPLC, Maldi-Tof et FTIR.

2) L'extraction des biomolécules pures à partir des extrait essentielles de grenade dont le but d'obtenir les meilleurs résultats *in vitro* et de cerner l'effet de ces molécules sur l'expression de fonctions microbiennes.

3) Etude des effets antibactériens séparés des biomolécules des extraits et les effets synergiques de ces molécules.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques :

[1] : Bruneton J, 2009 - Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales , (4e ed. Lavoisier) 1292p.

[2] : **Mautrait C. et Raoult R., 2009 -** La préparation : mode d'emploi. Les nouvelles recommandations des BPP, toutes les étapes de la préparation, notions théoriques indispensables, formules et modes opératoires (officine, sous-traitance et BP).Warters Kluwer, 3Ed, 11.

[3] : Rasheed Z. and Akhtar N., 2010 -"Pomegranate extract inhibits the interleukin-1betainduced activation of MKK-3, p38alpha-MAPK and transcription factor RUNX-2 *in* human osteoarthritis chondrocytes." Arthritis Res Ther 12(5): R195.

[4] : Svoboda K. P. and Hampson J. B. 1999 – Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars.

[5] :Wald E., 2009 - Le grenadier *Punica granatum* : Plante historique et evolution thérapeutiquerécentes. Universite Henri Poincare.Thése.158p.

[6] : Spilmont. M, 2013- Intérêt de la grenade dans la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose : rôle des fractions lipidiques et polyphénoliques, approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I).

[7] : Levin, G. M. ,1994 - "Pomegranate (*Punica granatum*) plantgenetic resources in Turkmenistan." Plant Genetic Resources Newsletter 97: 31.

[8] :Newman D.J., 2007 - Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, J Nat Prod. Mar;70(3):461-77.

[9] : INRAA , 2006: Institut National De La Recherche Agronomique D'algérie ; Deuxième rapport national sur l'état des Ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture, p. 68, Algérie.

[10] : Dallas, S. L. and Bonewald L.F. 2010 - "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte." Ann N Y Acad Sci 1192: 437-443.

[11] : Lansky E.P, Newman R.A, 2007 - *Punica granatum* (pomegranate) and its potential l'or prevention and treatment of inflammation and cancer, Journal of Ethno pharmacology, 109: 177-206.

[12] : **Aviram S., Volkova S., Davidson N., Maki L.2008 -** Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. J Agric Food Chem. 13;56(3):1148-57.

[13] : **Mc Farlin, B. K., Strohacker K, 2009 -"**Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice." Br J Nutr 102(1): 54-59.

[14] : Al-Muammar, M. N. and F. Khan, 2012 -"Obesity: the preventive role of the pomegranate (Punica granatum)." Nutrition 28(6): 595-604.

[15] : **Forest, C. P., Padma-Nathan H., 2007 -** "Efficacy and safety of pomegranate juice on improvement of erectile dysfunction in male patients with mild to moderate erectile dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study." Int J Impot Res 19(6): 564-567.

[16] : Haidari, M., Ali M, 2009 "-Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir." Phytomedicine 16(12): 1127-1136.

[17] : **Afaq F., Malik A, 2005 -** "Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign." Photochem Photobiol 81(1): 38-45.

[18] : Naovi, S. A. H., Khan, M. , 1991 - "Antibacterial, anti-fungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants." Fitoterapia 62: 221.

[19] : Nagaraju N et Rao, .N., 1990 – Asurvey of plant crude drugs of Rayalaseema Andhra bradeesh, India. J Ethnopharmacol. 29(2):137-58.

[20] :Boukef, K., Souissi, H ., 1982 - "Contribution to the study of plants used in traditional medicine in Tunisia." Plant Med. Phytother. 16: 260.

[21] :**Caceres, A., Giron L.M, 1987 -** "Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases." J Ethnopharmacol 20(3): 223-237.

[22] : **Gujral, M.L., Varma, D.R. and Sareen, K.N. , 1960**-Oral contraceptives. Part I. Preliminary observations on the antifertility effect of some indigenous drugs. Indian Med .Res. 48: 46-51.

[23] : Saxena A. et Vikram K., 2004 – Role of selected Indian plants in managment of type to diabetes : a Review. J Altern Complement Med. 10(2):369-78.

[24] : **Gil M., Tomas Barberan F., 2000 -** Antioxidant activity of pomegranat role of the pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem. 48(10):4581-9.

[25] : Khan F ., 2012 - Multidisciplinary rehabilitation following botulinum toxin and other focal intramuscular treatment for post-stroke spasticity. _The Journal of Pain 8 (8), 614-623.

[26] :Urquiaga I, et Leighton F., 2000- Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress, Biological Research, 33(2): 55-64.

[27] : **Macheix J J, Fleuriet A, et Jay–allemand C., 2005-** Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Pressespolytechnologiques et universitaires romandes, p4-5.

[28] : Jean E, 2010 - Amyrtille (*Vaccinium myrtillus*) : Botanique, chimie et intérêts thérapeutiques thèse Université Henri Poincaré.

[29] :Karaali A, Boyacioălu D, Gönez G, et Ŏzçelik B, 2004 - Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA, European commision's the 6thframework programme for research, Istanbul technical university, Turkey.

[30] :**Malešev D, et Kuntić V, 2007-** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions, Journal of the serbian chemical society, 72 (10): 921-939.

[31] : Nijveldt R. J, Van Nood E, 2001 -Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, American journal of clinical nutrition, 74: 418-425.

[32]: **Ghedira k, 2005-** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie, 3(4) : 162-169.

[33] :Athamena S, 2009 : Etude quantitatives des flavonoïdes des grains de Cuminumcyminum et les feuilles de Rosmarinusofficinalis et l'évaluation de l'activité Biologique, Thèse de Magister, Université de Batna.

[34] :Ben Abdennebi Moh A, 2012-Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK, Université de Montréal.

[35]: Anahita A, Asmah R, Fauziah O, 2014 - Antioxidanteffect of pomegranate against treptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats, Toxicology Reports 1, 915–922.

[36] : Rajan S, Mahalakshmi S, 2011- antioxidant potentials of *punica granatum* fruit rind extracts, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical S ciences, Vol 3, Issue 3.

[37] : Naseem U, Javid A, Farhat A, Muhammad K, ArshadHussain A, Inayat-ur-Rahman,Zia-ur-Rahman et Shafqatullah, 2012 - Proximate Composition, Minerals Content, Antibacterial and antifungal Activity Evaluation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels Powder. Middle-East Journal of Scientific Research 11 (3): 396-401.

[38] :Saleha A, Amit S, 2014- Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of rind of *Punica granatum*; international journal of advances in pharmacy, biology and chemistry, vol, 3(3).

[39]: Uma Maheswar R, Manasa N, 2012- comparative evaluation of anti-microbial activity of punica granatum leaves extracts, International Journal of Pharmacy Practice & Drug Research, 2(2), 98-104.

[40] : Chahnez S, 2013- Effet de l'Irradiation sur les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et cytoprotectrices de l'écorce de *Punica granatum* J. biol;3 :43-90.

[41]: Rodrigo N, Cavalcanti, Helmut J , 2012- Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Polyphenols from Pomegranate (Punica granatum L.) Leaves: Chemical Composition, Economic Evaluation andChemometric Approach, Journal of Food Research,Vol, 1, No. 3.

[42] :Belkacem N, 2009 : Contribution à l'étude des propriétés antidiabétiques de *Punica granatum*. L (grenadier) chez le rat diabétique , Unversité Abou Bekr Belkaïd ,Tlemcen.

[43] :Fatma L , Ahmed H, 2009- Effect of Pomegranate (*Punica granatum*). Peels and It's Extract on Obese Hypercholesterolemic Rats, Pakistan Journal of Nutrition 8 (8), 1251-1257.

[44] : Gene B., Smart S, 2009-Pomegrante Extract, Literature Education Series On Dietary, Huntington College of Health Sciences, 1-2.

[45] : Saeed A , Tariq I, 2005- Pomegranate peel and peel extracts, Chemistry and food features ,Food Chemistry 174 , 417–425.

[46] :Wei Z, Jianke L, 2014- *In vitro* steatosis hepatic cell model to compare the lipid-lowering effects of pomegranate peel polyphenols with several other plant polyphenols as well as its relatedcholesterol efflux mechanisms, Toxicology Reports 1, 945–954.

[47]: Pei-Tzu W, 2013- Effects of pomegranate extract supplementation on cardiovascular disease risk and physical function in patients with chronic renal failure, These Doctorate de philosophie en Kinesiologie, Graduate College, University of Illinois, Urbana-Champaign, USA.

[48] : Selvaraju S, Nady B, 2015 - Long-term (15 mo) dietary supplementation with pomegranates from Oman attenuates cognitive and behavioral deficits in a transgenic mice model of Alzheimer's disease; Nutrition 31, 223–229.

[49]: Ángel A, 1999- Carbonell Barrachina, Ing,Ángel Calín Sánchez, universidad miguel hernández, Département de Technologie Agroalimentaire).

[50] :Aslam M.N, Lansky E.P, Varani, J, 2006- Pomegranate as a cosmeceutical source, pomegranate fractions promote proliferation and procollagen systhesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. J. Ethnopharmacol, 103, 311–318.

[51] :Afaq F, Zaid M.A, 2008- Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconsti-tuted skin, Exp, Dermatol, 18, 553–561.

[52] :**Kulkarni S.S, Gokhale A.V, 2011-** Cotton dyeing with natural dye extracted from pomegranate (*Punica granatum*) peel, Univ. J, Envi-ron, Res, Technol, 1,135–139.

[53] :**Ioannis A, George Z. K, 2014 -** Agricultural peels for dye adsorption, A review of recent literature, Journal of Molecular Liquids 200 ,2014, 381–389.

[54]: Sweetie R. K, Rao M.S, 2012- Active chitosane polyvinylalcohol films with natural extracts, Food Hydrocolloids 29, 2012, 290-297.

[55] : Benayad N, 2008 - Les huiles essentielles extraites des plantes medicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrees alimentaires stockees, laboratoire des substances naturelles et thermolyse eclair, département de chimie ,faculté des sciences de rabat.

[56] : Mishra, A.K., S.K. Dwivedi, N. Kishore, and N.K. Dubey. 1991- Fungistatic properties of essential oil of *Cinnamomum camphora*. Int. J. Pharmacogn. 29:259-262.

[57] : Justin K, 2004- Caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques.,56 : 204-299.

[58] :**Tayeb-Cherif Y, 2016-** L'activité antibactérienne des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* et de *Origanum vulgare* sur la bactérie *E.coli*.

[59] :Burt S, 2004 - Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223-253.

[60] :Kalemba D, 2003 - Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr.Med. Chem. 10: 813-829.

[61] : May J, 2000 -Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother*. 45: 639-643.

[62] : Caillet S, 2007 - Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobienne et leurs application potentiels en alimentaire. Laboratoire de recherche en science appliqué a l'alimentation (RESALA) INRS-institue Armand-Frappier, université de Laval (Québec).

[63] :Zhenbin W, Zhongli P, 2011- Extract of Phenolics From Pomegranate Peels, The Open Food Science Journal,2011, 5, 17-25.

[64] :Calín-Sánchez A, Martínez JJ, 2011- Volatile composition and sensoryquality of Spanishpomegranates (Punicagranatum L.), J Sci Food Agric, 2011 Feb, 91(3):586-592.

[65] : Mollasalehi S, Kashefi B, Hashemi-moghaddam H, 2013 - Comparison of Microwave-Assisted and Hydrodistillation Methods for Extraction of Essential Oil from Achilleamillefolium , Journal of Chemical Health Risks, 3(2): 39-46.

[66] :**Jacqline S, 2009 -** Les huiles essentielles, université de la reunion.

[67] :**Bushra S, Farooq A, Muhammad A, 2009-** Effect of Extraction Solvent/Technique on the AntioxidantActivity of SelectedMedicinal Plant Extracts ,Molecules, 14, 2167-2180.

[68] :**Mital J. Kaneria, Manisha B, 2012-** Effect of Extraction Techniques and Solvents on AntioxidantActivity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Leaf and Stem, Food AnalyticalMethods; 5(3).

[69] :**Ben Amor. B. 2011-"**Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes Actifs; Texturisation par détente instantanée contrôlée DIC".).

[70] :**Cai-ping Zhu , Xi-chuan Zhai, Lin-qiang Li, Xiao-xia Wu, Bing Li,., 2015-** Response surface optimization of ultrasound-assisted polysaccharides extraction frompomegranatepeel; Food Chemistry 177 (2015) 139–146.

[71] : Reza T, Elham H, Ali B, 2012 - Separation of phenol from various micellar solutions using MEUF Original research article ; 1-6.

[72] :Harish C T, Pratibha S, 2010- Evaluation of various techniques for extraction of natural colorants from pomegranate rind- Ultrasound and enzyme assisted extraction, Indiane Journal of Fiber & Textile Research, Vol.35, pp.272-276.

[73] : Charlotte B, 2016- Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest.

[74] : King, E.G., Kislukhin, G., Walters, K.N., Long, A.D, 2014- Using *Drosophila melanogaster* To Identify Chemotherapy Toxicity Genes. Genetics 198(1): 31--43.

[75] :Tenaillon O, 2010 -The population genetics of commensal Escherichia coli. Nat Rev Microbiol. 2010 Mar;8(3):207-17.

[76] : Koppolu A- 2016 -Biofuel Created by E.Coli in innovative products.

[77] : **Gordon D. et Cowling A., 2003 -**The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiology. 2003 Dec;149(Pt 12):3575-86.

[78] : Smati S., 2015- Strain-specific Impact of the High-Pathogenicity Island on Virulence in Extra-intestinal Pathogenic Escherichia coli . nternational journal of medical microbiology:IJMM

[79] :Walk L, 2007 - Self-Selection in the Relationship between the Built Environment

and Walking: Empirical Evidence from Northern California. Journal of the American Planning Association V 72.

[80] :Ishii S, 2006- Yeast Pth2 is a UBL domain-binding protein that participates in the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*25(23):5492-503.

[81] Ishii S et Sadowski M, 2008 - *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. Microbes Environ. 2008;23(2):101-8.

[82] : Dobrindt U , Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J.., 2003-Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal Escherichia coli isolates by use of DNA arrays. J Bacteriol. 2003 Mar;185(6):1831-40.

[83] : El Kouir D, 2003- Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. S1166-8598(07)416-787. .

[84] :**Chaibi A, 2015-** Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen., 2015).

[85] :Fauchere J.L., 2002- Bactériologie générale et médicale. Brocé, 350p.
[86] : Vincenot F, 2008 -Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Article *in* Revue Francophone des Laboratoires2008(407):61-69

[87] :Cimolai, 2008- Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Article *in* Revue Francophone des Laboratoires2008(407):61-69 .

[88] :Clotilde C, 2015-Impact des antibiotiques sur l'histoire naturelle de la colonisation nasale par *Staphylococcus aureus*. Paris .

[89] : Harris M, 2002 - Substrate binding induces domain movements in orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *J Mol Biol*318(4):1019-29.

[90] :von Eiff C, Jansen B, Kohnen W, Becker K.., 2005 -Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. Drugs. 2005;65(2):179-214.

[91] : Jain R. and Sanmati J ., 2011- Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Some Selected Anticancer Medicinal Plants from Chhattisgarh State, India. Pharmacologyonline 2: 755-762.

[92] : Otto, 2008- Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Some Selected Anticancer Medicinal Plants from Chhattisgarh State, India. Pharmacologyonline 2: 755-762.

[93] :Saga T. and Yamaguchi K., 2009 - History Of Antimicrobial Agents and Resistant *Bacteria. Japon Medical Association Journal*. 52(2).103-108.

[94] :Calgagno F., Lacroix R., 2011 - Pharma-memo Infectiologie. Paris, France : Ed : VernazobresGreco. 246 p.

[95] :Davies J, 2010- Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Review*. 74(3). 417-433)

[96] :Pechere J-C ,2004 - Le microbe intelligent. Paris, France : Editions Frizon-Roche. 240 p.

[97] :**Guinoiseau E, 2010-** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Corse.

[98] :Newman D.J, 2003- Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod. 2003 Jul;66(7):1022-37.

[99] :Fomba M , 2006-Rôle pathogène et sensibilité aux antibiotiques des *Acinetobacter* et des *Staphylococcus* a coagulasse négatif à l'hôpital du point G. thèse de doctorat en pharmacie, 200 p.

[100] : Lavigne J-P, 2007- Effet des antibioques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.

[101] :Goossens B et Chihi L ., 2006 - Genetic Signature of Anthropogenic Population Collapse in Orang-utans.

[102] : Yagupsky P, 2006 - Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. Pediatr Infect Dis J.;25(10):974-6.

[103] : Oliver P. et Murinda S., 2012 -Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens Article · Literature Review *in* Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice28(2):165-85.

[104] :Levy S.B. et Marshall B, 2004- Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med. 2004 Dec;10(12 Suppl):S122-9.

[105] :**Bourabah A, 2015-** Les mammites d'origine bactériennes et mycosiques chez la chèvre locale à Tiaret, traitement alternatif par le miel et l'huile de *Thymus fontanesil* . Mémoire master, 67p.

[106] : Hadhoum B, 2015- Extraction et évaluation de la qualité de l'extrait des écorces de Grenade.

[107] Benjilali A, tantaoui-elaraki A, ismaïl-alaoui M et ayadi A ., 1986- méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé , Plantes médicinales et phytothérapie,1986, 20,155-167.

[108] :Broadasky T. F, Lewis C, Eble T. E., 1976- Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal, I Clindamycin in the rat, J, Chromatogr, 123: 33-44.

[109] : **Edi-Prémono, 1996-** Evaluation des phosphates naturels pour l'application directe.

[110] : Bousbia N, 2011- Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Autre. Université d'Avignon.

[111] :Douâae O, 2015- Activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de : *Mentha piperita* et *Mentha pulegium*.

[112] : Larkin R.P et Fravel D.R, 1999-Mechanisms of Action and Dose-Response Relationships Governing Biological Control of *Fusarium* Wilt of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium* spp. Phytopathology. 1999 Dec;89(12):1152-61. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.12.1152.

[113] :Oussou K et Coffi K ., 2004-Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire**.** Comptes Rendus Chimie Volume 7, n° 10-11 pages 1081-1086.

[114] :Elharas Ket Daagar A., 2013 - Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus Nobilis* et Lavandula Angustifolia. Afrique SCIENCE 09(2) (2013) 134 – 141.

[115] :Laprent, JP and Laprent – Gourgaud M., 1985- Eléments de microbiologie, :Paris:Hermann.

[116] : Reddy , MK., Gupta, SK., Jacob ,MR., Khan ,SI y., Ferreira, D. Planta Med., 2007, (2007) 461–467.

[117] :Al-Zoreky, N.S, 2009-International Journal of Food Microbiology; 134 (2009) 244–248.

[118] :**Choi JG., Kang, O.H., Lee, Y.S., Chae, H.S., Oh, Y.C., Brice, O.O., Kim, M.S., Sohn, DH., Kim, HS., Park, H., Shin, DW., Rho ,JR y., Kwon, DY. 2013-** Evid Based Compl Alter *Med . Afrique SCIENCE 09(2) (2013) 134 – 1411–8.*

[119] :**Ali Shtayeh M-S., Yaghmour R-M-R., Faidi Y-R., Salem K., Al Nuri M-a ; 1998. -** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. -Journal of Ethno Pharmacology, 265-271.

[120] : King A., Young G ; 1999-Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals . -Journal of the American dietetic association, 213-218.

[121] : Benabbou M, 2012-Antibio-résistance des bactéries lactiques isolées de produits artisanaux algériens.

[122] :Bud, R, 2007- Penicillin: Triumph and tragedy. Norfolk, Angleterre, Oxford University Press. 340 p.

[123] :**Chain, E, Florey, H.W., Gardner, A.D. , 1940 -** Penicillin as a chemo therapeutic agent. *Lancet,* 236: 226-228.v).

[124] : **Cavallo J-D, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E., 2004 -** Bêtalactamines. EMC Maladies infectieuses. 1 : 129-202.

[125] :Fauchère J-L, Avril J-L ., 2002- Bactériologie générale et médicale. Ed ellipses. pp 280.

[126] :Fisher J-F, Meroueh S-O ., 2005 - "Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity". Chem Rev 105 (2):395-424.

[127] :Girardin A., and M. Walter, 1992- Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. Proceedings of the 50th New Zealand Plant Protection Conference, August 18-21, 1997, Lincoln, pp: 159-164.

[128] : Gurgel 2009- Erkan, M., T. Demir, S. Oz and N. Delen, 1997. Investigations on the sensitivities of gray mold (*Botrytis cinerea*) isolates on grapes against some fungicides. J. Turk. Phytopathol., 26: 87-96.

[129] :Da Costa , 2010 -Antifungal Food Additives. In: H and Book of Applied Mycology, Vol. 3. Foods and Feeds, Arora, D.K., K.G. Mukerji and E.H. Marth (Eds.). Marcel Dekker, New York, USA., pp: 541-52.

[130] : Kurita, T.E. and D.F. Loncrini, 1982 -Esters of Para-Hydroxybenzoic Acid. In: Cosmatic and Drug Preservation, Kabara, J.J. (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp: 63-77.

[131] :Bouchikhi S.C., V.M. Anthony, A.M. Brady, A.J. Greenland and S.P. Heaney *l*., 1994 -Rationale and perspectives on the development of fungicides. Annu. Rev. Phytopathol., 35: 349-372.

[132] :Tantaoui-Elarki G., B.E. Langlois, D.D. Archbold, T.R. Hamilton-Kemp and M.M. Barth, 1996 -Microbial populations of *Botrytis cinerea*-inoculated strawberry fruit exposed to four volatile compounds. J. Food Protect., 61: 1352-1357.

[133] :Faid M.V.B., P. Angers, A. Gosselin and J. Arul, 1996- Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry, 47: 1515-1520.

[134] : Chang I., F. Munoz, M. Carbu, L. Rebordinos, F.J. Fern andez-Acero and J.M. Cantrol, 2001- Study on fungicides resistance of *Botrytis cinerea* isolates from diseased strawberry plants. Arch. Phytopathol. Plant Prot., 36: 1-7.

[135] :Karaman A. and P.J. Weller, 2001 -Handbook of Pharmaceutical Excipients. The Pharmaceutical Press, London.

[136] : Baydat I.M. and T. Eklund, 2004- Microculture model studies on the effect of sorbic acid on *Penicillium chrysogenum, Cladosporium cladosporioides* and *Ulocladium atrum* at different pH levels. J. Applied Bacteriol., 74: 191-195.

[137] :Pibiri, 2005 - Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. Plant Pathol., 50: 601-608.

[138] :Satrani W.F., 2006- Sorbic hydroxamic acid, an antifungal agent effective over a wide pH range. Applied Microbiol., 11: 362-364.

[139] : Lee S, Dix, N.J. and J. Webster, 1985- Fungal Ecology. Chapman and Hall, London, pp: 549.

[140] :Tantaoui-Elarki R, Delen, N., M. Yildiz and H. Maraite, 1994- Benzimidazole and dithiocarbamate resistance of *Botrytis cinerea* on greenhouses crops in Turkey. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Genet., 49: 153-161.

[141] : Obeng-Ofori C.A. and V.W. Yang, 1997- Mold inhibition on unseasoned Southern pine. Proceedings of the 34th Annual Meeting of International Research Group on Wood Preservation, May 18-23, 2003, Brisbane, Australia, p 9 **.**

[142] : Prates K.S.H., J.H. Perry and M. Walter, 1998- Persistence and survival of saprophytic fungi antagonistic to *Botrytis cinerea* on kiwifruit leaves. Proceedings of the 51st New Zealand Plant Protection Conference, August 11-13, 1998, Lincoln, New Zealand, pp: 96-101.

[143] :Inouye F.G, 2001 - Baraldi, E., P. Bertolini, E. Chierici, B. Trufelli and D. Luiselli, 2002. Genetic diversity between *Botrytis cinerea* isolates from unstored and col stored kiwi fruit. J. Phythopathal., 150: 629-635.

[144] : Pibiri N, 2005 - Identifying natural volatile compounds that control gray mold (*Botrytis cinerea*) during postharvest storage of strawberry, blackberry and grape. J. Agric. Food Chem., 45: 4032-4037.

[145] :Suschke Y. and H. Itani, 2006- Resistance of *Botrytis cinerea* isolates to fungicides used in lubanon. Proceedings of the 9th Congress of the Mediterranean Phythopatholgy Union, September 18-24, Kuadasi-Aydin, Turkey, pp: 373-.

[146] :Chaumont D.L, 1989 - Control of the phytopathogen *Botrytis cinerea* using adipic acid monoethyl ester. Arch. Microbiol., 184: 316-326.

[147] : Lattaoui L, 1994 - nhibition of conidium germination and mycelial growth of botrytis cinerea by natural products, 50th N.Z plant protection conf, (1994) 159-164.

[148] :Senatore M, 2004- effet diurétique de l'infusion de fleurs de Lavandula officinalis-, , reprod Nutr.dev. 41,393-399.

[149] :Malecky M, 2007-The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. Journal of Ethnopharmacology. 108, 31–37.

[150] :Nikitina R, 2009 -Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays., journal of agricultural and food chemistry. (2009) 57, 1768–1774.

[151] Franchomme, 1981 - radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts.,journal of the Iranian chemical society 3 (3) 258-266.

[152] Gueldner F, 1985- Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis L. Leaves* and *Foeniculum vulgare* subsp. piperitum (Ucria) Coutinho Seeds. Biol. Pharm. Bull29 (10) 2056-2064.

[153] :Kivanc K, 1988 -effet of *Laurus nobilis* (lauraceae) on Biomhalaria glabrata (say,1818). Mem.inst.oswaldo cruz, Rio de janeiro, intern.symp. on Schistosomiasis. suppl.IV, 315-320.

[154] : Thomson, 2003 -Antibacterial and Antifungal Activities of Turkish Medicinal Plants, Pharmaceutical Biology, 39 (5) 346–350.

[155] Burt, 2004 - Antibacterial and Antifungal Activities of Turkish Medicinal Plants, Pharmaceutical Biology, 39 (5) 346–350.

[156] :Zhiri S, 2005- *in vitro* activity of essential oils, in particular Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and tea tree oil products, against Candida spp., journal of antimicrobial chemotherapy. 42,591-995.

[157] :Viuda-Martos, Ganière J, Mangion C, Péridy., 2008-Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacine, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. - Rev. Méd. Vét.155 (8-9), 411-416.

[159] : Kanai, 1983 – Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated Laurus nobilis L. Leaves and Foeniculum vulgare subsp. piperitum (Ucria) Coutinho Seeds. Biol. Pharm. Bull. (2006) 29 (10) 2056-2064.

[160] :Pohl et , 1980 -In vitro activity of essential oils, in particular Melaleuca calternifolia (tea tree) oil and tea tree oil products, against Candida spp., journal of antimicrobial chemotherapy. 42,591-995.

[161] :Renault L, Metin D., M. Hakki A and Ahmet I., 1987: Antibacterial and Antifungal Activities of Turkish Medicinal Plants, Pharmaceutical Biology, (2001) 39 (5) 346–350.

[162] :Chaslus-Dancla E., Guillot J.F. & Lafont J.P.,1979- Evolution de l'antib iorésistance bacté- rienne dans les élevages avicoles. Ann. Rech. Vet. 10, 77-86

[163] :**Kanai H, 1983**- Drug-resistance and distribution of conjugative R plasmids in Escherichia coli strains isolated from healthy adult animals and humans. Jpn J. Vet. Sci. 45, 171-178.

[164] :**Pohl P., Froyman R., Van Tilburg J. & Halen P.,1980**-Etude des plamides R des entérobacté-ries banales de la poule et du poulet. Ann. Med. Vet 124, 443-448.

[165] :Renault R., Raynaud J.P., Bretheau H., Aycardi J., Roux J. & Ferrando R. ., 1973- Résistance aux agents antibactériens des Escherichia coli de la flore intestinale de volailles recevant ou non des antibiotiques à dose nutritive dans leur alimentation. Rech. Med. Vet 149, 637-650.

Biblio-net :

(*)https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/antibio/Pages/utilisation_antibiotiques.aspx

(**)https://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/antibiotiques-effets-indesirables

(***)http://infometiers.org/ISM/Publications/Ouvrages/Les-nouvelles-technologies-dans-l-alimentaire ,date de dernière consultation est le 02/02/2018).

(****) Mémoire : Piquemal G,2008, Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215

(*****) https://fr.wikipedia.org/wiki/Extraction_(chimie) (consulté : 19/06/2015).

(******) https://www.antibio-responsable.fr/maladies/gastroenterologie (consulté le 14/04/2018).

(*******) http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/

(********) https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/effets-indesirables.html (consulté le 12/04/2018).

(*********) http://www.gammvert.fr/2-1212-plantes-dexterieur/2-1231-arbustes/3-318-arbustes-a-floraison-printaniere/p-26964-grenadier-dornement-maxima-rubra#product-section-1 (consulté le 04/04/2018).

(**********) https://sante medecine.journal desfemmes.fr/faq/34315-cyclines-tetracyclines-definition (consulté le 30/05/2018).

(***********) https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-cycline-9183/ (consulté 30/05/2018).

(************) https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites /item /sulfamides-antibacteriens (consulté le 30/05/2018)

Annexes

Annexe I :

1. Milieux de culture :

1.1. Milieu Baird-Parker

a. Composition :

-Peptone……...……..10g

-Extrait de viande de bœuf……. 4g

-Extrait de levure…….....2g

-Pyruvate de sodium……..10g

-Glycocolle……....12g

-Chlorure de lithium……....5g

-Agar-agar…….20g

-Eau distillée ……...…….1000mL

A ajouter en conditions stériles juste avant l'ensemencement :

-Emulsion de jaune d'œuf (stérile)……..50mL

-Tellurite de potassium (stérile)……0.1g

pH du milieu = 7.2

b. Préparation :

1. Mélanger les ingrédients.

2. Verser la poudre dans un litre d'eau distillée.

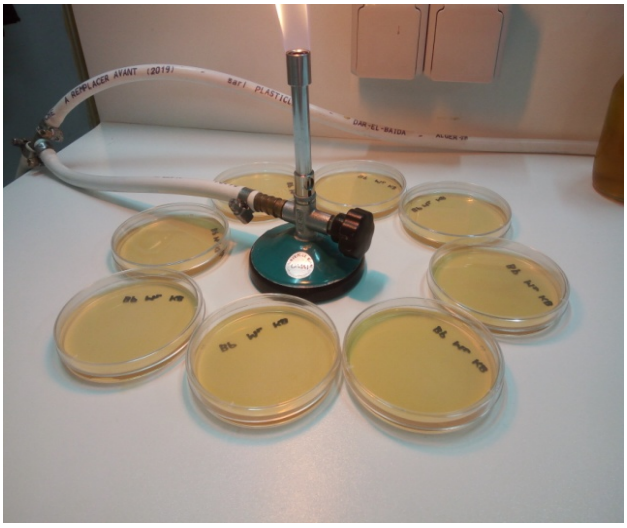
3. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

4. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

5. Laisser refroidir jusqu'à 50°C et ajouter stérilement 50 ml d'émulsion de jaunes d'œufs avec tellurite. Bien mélanger et répartir.

6. Couler les boites de pétri devant le bec benzène.

Les boîtes de Pétri ainsi préparées doivent être conservées à 2-8°C.



Milieu Baird-Parker

1.2. Milieu VRBL :

a. Composition :

-Peptone…….…….7g

-Extrait de levure…….3g

-Lactose…….10g

-Chlorure de sodium……5g

-Mélange sel biliaire…….1.5g

-Cristal violet……0.002g

-Rouge neutre…….0.03g

-Agar-agar…….15g

-Eau distillée ……....1000mL

-pH = 7.4

b. Préparation :

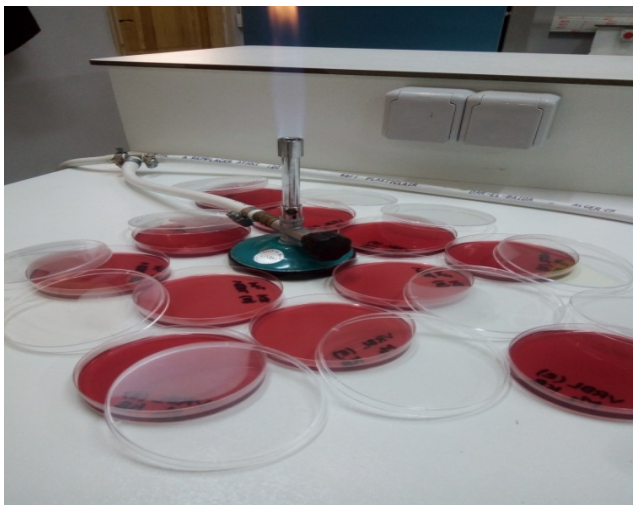
1. Mélanger les ingrédients.

2. Verser la poudre dans un litre d'eau distillée.

3. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Ne pas autoclaver. Bien mélanger et répartir.

4. Couler les boites de Pétri.



Milieu VRBL

2. Réactifs :

-Violet de gentiane

-Lugol :

a. Composition :

-Iode…...……....10g

-Iodure de potassium (IK)…...……...…20g

-Eau distillée…….....100mL

b. Préparation :

Préparez 20 g de iodure de potassium (KI)

Dissout dans 100 mL d'eau distillée en agitant.

Préparez 10 g de l'iode (I_2)

Versez dans la solution aqueuse de KI

-Alcool Ethanol (C_2H_6O)

-Rose de fuschine

-Eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes

-Eau distillée

-Eosine

-Eau physiologique stérile :

a. Composition :

-Na Cl...…….…….…….2.5g

-Eau distillée…….…...500mL

b. Préparation :

1. Peser 2.5g de Na Cl
2. Ajouter le sel à 500ml d'eau
3. Agitation
4. Autoclavage (121°c pendant 30min)

-Hypochlorite de calcium.

-Les huiles essentielles de pelle de grenade

-Les antibiotiques

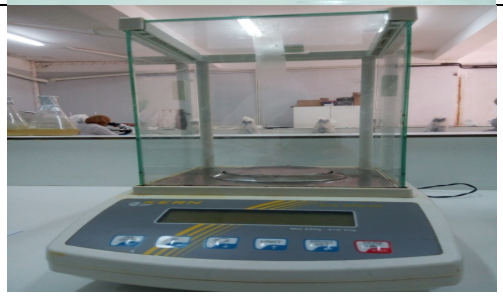
Streptomycine ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$)

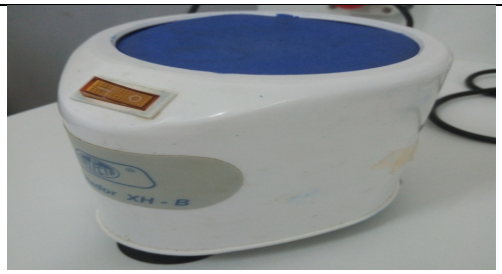
Pénicilline ($C_{10}H_{13}N_2O_4S$ - R,)

Tétracycline ($C_{22}H_{24}N_2O_8$)

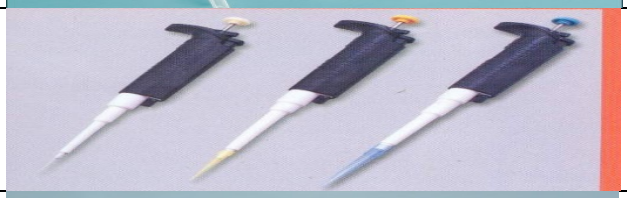
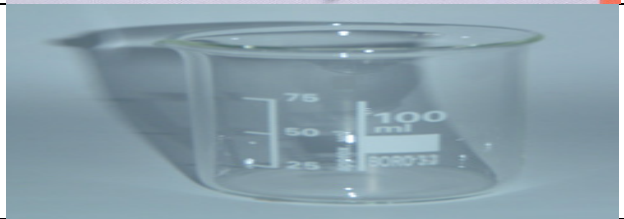
Sulfamide ($H_2NSO_2NH_2$

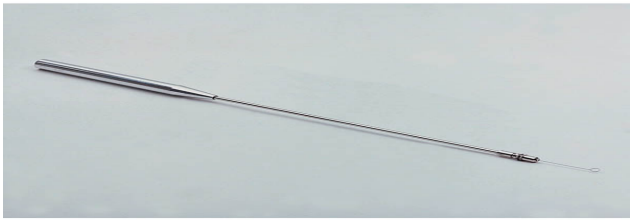
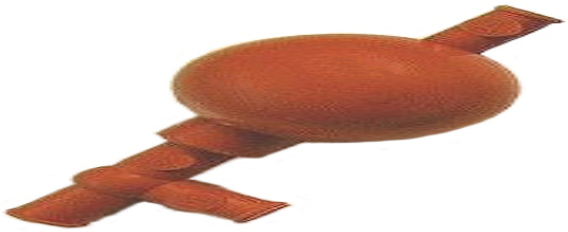
3-Liste du matériel utilisé durant les étapes du traitement:

Instruments	Utilisation	Type d'appareillage
1- Bec bensène	Pour assurer une stérilisation instantanée.	
2- Bain marie	pour la transfusion des milieux de culture	
3-Autoclave	stérilisation á la vapeur	
4-Réfrigérateur	conservation des souches et des réactifs	
5-Microscope optique	Observation des micro-organismes	
6-Balance de précision	Pèse les produit et les composantes des milieux	

7-Agitateur magnétique de type vortex	Agitation et homogénéisation des solutions	
8-Incubateur	Incubation des cultures de micro-organismes	
9-Centrifugeuse	Séparation des fractions des solutions	

4-Verrerie :

1-Pipettes Pasteur et en plastique	-pour l'inoculation et l'ensemencement -coloration de Gram	
2-Micropipette	pour une prise très précise	
3-Becher á différents volumes	Contenir les solutions, les suspensions	
4-Verre á pied (200cc, 60cc)	Utilisation pendant la filtration	

5-Lames et lamelles	Faciliter l'observation microscopique	
6-Tubes à essai	Préparation des dillutions des suspensions bactériennes	
7-Boites de Pétri	Mise en culture dans des milieux nutritifs	
8-Anse de platine	Ensemencement des colonie bactériennes	
9-Portoirs	Porte les tubes à essai	
10-Poires	Aspirer les solutions	

Annexe II

Table statistique de t

La table donne la probabilité **P** pour que **t** égale ou dépasse, en valeur absolue, une valeur donnée, en fonction du nombre de degrés de liberté (**d.d.l**.).

P / ddl	0.90	0.50	0.30	0.20	0.10	***0.05*** ↓	0.02	0.01	0.001
1	0.158	1.000	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619
2	0.142	0.816	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	0.137	0.765	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.924
4	0.134	0.741	1.190	1.533	2.132	**2.776**	3.747	4.604	8.610
5	0.132	0.727	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869
6	0.131	0.718	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	0.130	0.711	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408
8	0.130	0.706	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	0.129	0.703	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	0.129	0.700	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	0.129	0.697	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	0.128	0.695	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	0.128	0.694	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	0.128	0.692	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	0.128	0.691	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	0.128	0.690	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	0.128	0.689	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	0.127	0.688	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	0.127	0.688	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	0.127	0.687	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	0.127	0.686	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.836	3.819
22	0.127	0.686	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	0.127	0.685	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	0.127	0.685	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	0.127	0.684	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	0.127	0.684	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	0.127	0.684	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	0.127	0.683	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	0.127	0.683	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	0.127	0.683	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
∞	0.126	0.674	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291