

THESE DE DOCTORAT en SCIENCES

Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Nutrition et Santé

THEME

**Effet préventif de l'écorce de grenade (*Punica granatum L.*)
vis à vis du trouble oxydatif et du microbiote intestinal
associés aux lésions précancéreuses chimio-induites chez le
rat Wistar.**

Présentée

Par

BENGUIAR Rachida

Soutenue le : 22 Décembre 2020

Devant le Jury composé de :

Président :	Pr. Hammadi Kheira	Univ. Mostaganem
Directeur de thèse :	Pr. Riazi Ali	Univ. Mostaganem
Examineurs :	Pr. Boualga Ahmed	Univ. Oran 1
	Pr. Krouf Djamil	Univ. Oran 1
	Dr. Benhamed Nadjia (MCA)	Univ. USTO Oran
	Dr. Ziar Hasnia (MCA)	Univ. Mostaganem

Année universitaire : 2019-2020

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère pour son amour, son soutien et son sacrifice.

Ainsi qu'à la mémoire de mon père.

A mes chers sœurs et frères.

A mes chers neveux et nièces : Marwa, Abd elrahman, Rachida, Rawan, Abd elhamid,

Badr eddine et Jawed....

A mes chères amies : Rachida, Meriem, Assia, et Katiba.

*Ce travail est également dédié à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa
réalisation.*

Avant- propos

Le présent travail a été réalisé pour sa majeure partie au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem dirigé par le Professeur Riazi Ali et pour certaines manipulations dans d'autres laboratoires : Laboratoire Amélioration et valorisation des productions animales locales, Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques de Bou-Ismaïl Alger.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Pr Riazi Ali, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Il m'a fait profiter de sa longue expérience en matière de recherche ; ses conseils m'ont été fort utiles et j'ai appris avec lui toute l'importance du plus petit pour construire le plus grand. Je vous exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance.

J'adresse vifs remerciements à Mme Hammadi Kheira, Professeure en Microbiologie à l'université Abdelhamid Ibn Badis, pour m'avoir honorée en présidant mon jury de thèse. Je suis certaine que son expérience de recherche sur la grenade sera très enrichissante pour moi.

Je remercie également Mr Boualga Ahmed, Professeur en Nutrition clinique à l'université Ahmed Benbela d'Oran 1, pour avoir accepté de participer à mon jury et d'apporter ses critiques scientifiques à mon travail.

Mr Krouf Djamil, Professeur en Nutrition clinique à l'université Ahmed Benbela d'Oran 1, a eut l'amabilité d'accepter d'examiner cette thèse ; qu'il trouve ici l'expression de mes vifs remerciements.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Benhamed Nadjia, Maître de conférences de classe A en Microbiologie à l'université Mohamed Boudiaf USTO d'Oran pour son accord de participation à mon jury de thèse. Ses critiques scientifiques seront les bienvenues.

Mme Ziar Hasnia, Maître de conférences de classe A en Nutrition humaine à l'université Abdelhamid Ibn Badis, a accepté de participer à l'examen de ma thèse, je lui adresse mes remerciements pour les critiques constructives qu'elle pourra apporter à ce travail.

Je remercie particulièrement Mme.Benaraba R., Professeure à l'université Ibn Khaldoun de Tiaret, pour son aide, son soutien, sa disponibilité, ses encouragements, et ses conseils très précieux.

Je tiens également à remercier Dr. Boumezrag A. pour son aide et son soutien, Dr. Henniche A., Médecin en Anatomie-pathologie à l'hôpital Frantz Fanon (Blida) ainsi que Dr.Hemida H., enseignant à l'Institut Vétérinaire de Tiaret, pour son aide dans l'étude histo-pathologique.

Résumé

Le cancer du côlon constitue un véritable problème de santé publique, par son impact socio-économique, sa fréquence et sa gravité. A l'heure actuelle, la recherche évoque que les molécules bioactives issues de la pharmacopée traditionnelle, pourraient constituer des facteurs prometteurs, dans les stratégies préventives nutritionnelles contre ce type de cancer. L'objectif de cette étude consiste à évaluer, dans un premier temps, l'activité antioxydante et antibactérienne in Vitro des extraits phénoliques issus de l'écorce de grenade et dans un deuxième temps, d'étudier, in Vivo, l'effet préventif de ce fruit, associé ou non aux probiotiques, vis-à-vis des altérations oxydatives et de la dysbiose intestinale liées aux lésions précancéreuses coliques chimio-induites. La caractérisation des composés phénoliques des extraits d'écorce de grenade a été déterminée par la technique de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). L'activité antioxydante a été évaluée par la technique du pouvoir réducteur ferrique (FRAP). Alors que l'activité antibactérienne a été testée sur des bactéries Gram positives et négatives, en utilisant les méthodes de diffusion sur gélose et la microdilution. En parallèle, cette étude a été menée sur 36 rats mâles Wistar répartis en 6 groupes. Les deux premiers groupes sont des témoins négatifs constitués des animaux non traités par la 1,2 Diméthylhydrazine (DMH) et soumis soit à un régime standard (G1), soit à un régime hyper-gras (G2). Les rats des groupes 3 et 4 sont des témoins positifs, soumis au même régime cité précédemment (soit le régime standard (SD) ou hyper-gras (HG)) et traités par DMH. Tandis que, les rats des groupes 5 et 6 ont été traités par DMH et nourris par un régime HG supplémenté de 2.5% (p/p) d'écorce de grenade seule (G5) ou associée à un mélange de probiotiques (G6). Après 16 semaines d'expérimentation, une évaluation des paramètres biochimiques, oxydatifs et microbiologiques ainsi qu'un examen histopathologique du côlon ont été réalisés. Les résultats obtenus montrent que l'analyse phytochimique des composés phénoliques des extraits d'écorce de grenade dévoile des quantités comparables. Cependant, l'extrait éthanolique présente un pouvoir réducteur puissant comparé à celui obtenu par l'extrait méthanolique. Les deux extraits exercent un effet antibactérien important et variable vis-à-vis des souches bactériennes testées avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ordre de 0.97 et 15.62 mg/mL et une concentration minimale bactérienne (CMB) entre 7.81 et 250 mg/mL. Parallèlement, les résultats de l'étude in Vivo révèlent que l'écorce de grenade combinée ou non aux probiotiques rétablit, chez les rats des groupes G5 et G6, les désordres oxydatifs au niveau plasmatique, ceci se traduit par une augmentation de 88% du pouvoir réducteur, de 67 à 75% des groupements thiols et une réduction de 55 à 66% de taux de malondialdéhyde (MDA). Aussi, il améliore l'architecture histologique du côlon lésé et ce, en comparaison avec le témoin positif G4. Ce traitement induit une diminution des bactéries pathogènes (une réduction de 58 à 60% d'*E.coli* et de 42 à 58% *des Bacteroides* sp.) et une augmentation des bactéries probiotiques (*Lactobacillus* sp. 92% et *Bifidobacterium* sp. 52 à 117%). Ces résultats laissent à suggérer que l'écorce de grenade agit comme un agent chimio-préventif efficace contre les lésions pré-néoplasiques chimio-induites.

Mots clefs : *Ecorce de grenade (Punica granatum L.)* ; Probiotiques ; Microbiote intestinal ; Stress oxydant ; Cancer du côlon ; Composés phénoliques.

Abstract

Colon cancer is a real public health problem, due to its socio-economic impact, its frequency and its severity. Currently, research suggests that bioactive molecules derived from traditional pharmacopoeia could constitute promising factors in preventive nutritional strategies against colon cancer. The aim of this study was to assess, firstly, *in Vitro* the antioxidant and antibacterial activities of the pomegranate peel extracts and secondly, to study *in Vivo* the preventive effect of this fruit alone or associated with probiotics against the oxidative disorders and intestinal dysbiosis linked with chemically-induced precancerous lesions in rat colon. The characterization of the phenolic compounds of the pomegranate peel extracts was determined by the technique for high performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP). While the antibacterial activity was tested on Gram positive and negative bacteria, using agar diffusion and microbroth dilution methods. In parallel, this study was carried out on 36 male Wistar rats divided into 6 groups : Groups 1 and 2 are negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (SD) for G1 and high-fat diet (HFD) for G2; while Groups 3 and 4 are positive DMH-treated control receiving SD for G3 and HFD for G4. Groups 5 and 6 are DMH-treated and fed with 2.5% (w/w) pomegranate peel under HFD diet, and in the presence of probiotics for G6. After 16 weeks of experimentation, an evaluation of the biochemical, oxidative, microbiological parameters and histopathological examination of the colon were carried out. The results have shown that the pomegranate peel of both extracts contained a similar amount of phenolic compounds. However, the antioxidant activity was higher in ethanolic extract with EC_{50} value of $58.42 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ compared to methanolic extract ($EC_{50} = 80 \pm 1 \mu\text{g/mL}$). Both extracts exhibited a good and different antibacterial effect against the tested bacteria with minimal inhibitory concentration (MIC) values ranging from 0.97 to 15.62 mg/mL and minimal bactericidal concentration (MBC) values ranging from 7.81 to 62.5 mg/mL. At the same time, the results of the *in Vivo* study revealed that pomegranate peel alone or combined with probiotics induced a significant increase in ferric reducing ability of plasma levels by 88% and reduction in the malonaldehyde content by 55 to 66%. In addition, this treatment helps to improve the histological architecture of the colon in G5 and G6 groups rats, in comparison with HFD positive DMH-treated control group (G4). Furthermore, this treatment was also the most effective in decreasing the pathogenic bacteria amount which results in a 58 to 60% reduction of *E.coli* and 42 to 58% of *Bacteroides* sp. and increasing in beneficial bacteria such as *Lactobacillus* sp. (92%) and *Bifidobacterium* sp. (52 to 117%). These results suggest that pomegranate peel acts as a chemopreventive agent against preneoplastic lesions.

Keywords: Pomegranate peel (*Punica granatum* L.); probiotics; Intestinal microbiota; Oxidative stress; Colon cancer; Phenolic compounds.

ملخص

يعتبر سرطان القولون في وقتنا الراهن أكبر مشكل صحي يواجهه العالم، بسبب تأثيره الاجتماعي والاقتصادي وتواتره وخطورته ، تشير الأبحاث إلى أن الجزيئات النشطة بيولوجيًا المشتقة من الأدوية التقليدية يمكن أن تشكل عوامل واعدة في الاستراتيجيات الوقائية الغذائية ضد السرطان.

وفي هذا السياق، فإن الهدف من هذه الدراسة و هو تقييم فعالية النشاط المضاد للأكسدة و البكتيريا لمستخلصات قشر الرمان في المخبر كمرحلة أولى ثم دراسة التأثير الوقائي لها مع أو بدون البروبيوتيك على الجراثيم المعوية ، والإجهاد التأكسدي المميز بالإصابات ما قبل السرطانية ولهذا قمنا بتحديد التحليل الكيميائي النباتي للمركبات الفينولية لمستخلصات قشر الرمان بتقنية الكروماتوجرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) ، وتم تقييم نشاط مضادات الأكسدة عن طريق القدرة الإرجاعية (FRAP) بالإضافة إلى ذلك ، تم اختبار نشاطه المضاد للبكتيريا على البكتيريا موجبة وسالبة الجرام باستخدام طريقتي الإنتشار في الأجار والتخفيف الدقيق. من ناحية أخرى ، تم تقسيم 36 ذكر جرذان إلى 6 مجموعات المجموعتان 1 و 2 عبارة عن شاهد سالب لم تعالج ب 1,2 ثنائي ميثيل هيدرازين (DMH) وحصلت إما على نظام غذائي قياسي (G1) أو نظام غذائي عالي الدهون (G2) ؛ في حين أن المجموعتين 3 و 4 هي شواهد موجبة عولجت ب DMH ، وخضعت لنفس النظام الغذائي المذكور أعلاه (إما النظام الغذائي القياسي (SD) أو النظام الغذائي عالي الدهون (HG) حيث عولجت الجرذان في المجموعتين 5 و 6 ب DMH وتغذت بنظام HG مكمل ب 2.5٪ من قشر الرمان وحده (G5) أو مع خليط من البروبيوتيك (G6).

بعد 16 أسبوع من التجربة تم إجراء التحليل البيوكيميائي ومعايير التأكسد والفحص التشريحي للقولون والتحليل الميكروبيولوجي أظهرت النتائج المحصل عليها أن التحليل الكيميائي النباتي للمركبات الفينولية لمستخلصات قشور الرمان يكشف عن كميات مماثلة ومع ذلك ، فإن المستخلص الإيثانولي يظهر قوة القدرة الإرجاعية مقارنة بتلك التي حصل عليها المستخلص الميثانولي في الوقت نفسه ، بينت النتائج التأثير ضد البكتيري العالي و المتغير لمستخلصي قشور الرمان مقارنة بالسلالات البكتيرية التي تم اختبارها بأقل تركيز مثبت (CMI) بترتيب 0.97 و 15.62 مجم / مل وأقل تركيز للبكتيري (CMB) بين 7.81 و 250 مجم / مل بالإضافة إلى ذلك ، كشفت النتائج على الجسم الحي (in Vivo) أن قشر الرمان ، سواء تم دمج مع البروبيوتيك أم لا ، يعيد الاضطرابات التأكسدية على مستوى البلازما بزيادة قدرتها 88٪ في القدرة الإرجاعية ، من 67 إلى 75٪ من نسبة البروتينات ذات الروابط (هيدروجين - كبريت) ، وانخفاض من 55 إلى 66٪ في معدل MDA، ما أنه يحسن البنية النسيجية للقولون المصاب ، و هذا بالمقارنة مع مجموعة الفئران الشاهدة يؤدي هذا العلاج إلى تقليل البكتيريا المسببة للأمراض ، مما يؤدي إلى تقليل 58 إلى 60٪ من *E.coli* و 42 إلى 58٪ من *Bacteroides* وزيادة في البكتيريا النافعة *Lactobacillus sp.* 92٪ و *Bifidobacterium* .(52٪). تشير هذه النتائج إلى أن قشر الرمان يعمل كعامل وقائي كيميائي فعال ضد الإصابات ما قبل السرطانية التي يسببها العلاج الكيميائي.

الكلمات الدالة : قشر الرمان ، البكتيريا النافعة ، الجراثيم المعوية ، الاكسدة ، سرطان القولون. مركبات فينولية

Liste des abréviations

ADH	Arginine-Dihydrolase
AGCC	Acide Gras à Courte Chaînes
ALAT	Alanine Aminotransférase
ANOVA	Analyse de la variance à un critère de classification
AOM	Azoxymethane
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ASAT	Aspartate Aminotransferase
Bax	Bcl-2-associated X protein
BBE	Bile Bactéroïdes Esculine
BSH	Bile Salt Hydrolase
CAT	Catalase
CCR	Cancer Colorectal
CE₅₀	Concentration Effectrice
COX-2	Cyclooxygénase-2
Cdk	Kinase Dépendante Cycline
CuSO₄	Sulfate de cuivre
DMH	1, 2-diméthylhydrazine
DO	Densité optique
DTNB	5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque)
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate
ERO	Espèces Réactives de l'oxygène
ERN	Espèces Réactives d'azote
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCA	Foyer de crypte aberrante
FDM	Foyer Déplété en Mucine
FRAP	Pouvoir réducteur du fer ferreux (Ferric Reducing Ability Plasma).
GPx	Glutathion Peroxydase
GRAS	Generally Regarded As Safe
GSH	Glutathion réduit
HDL	Lipoprotéines de haute densité (High Density Lipoprotein)
HG	Hypers-gras
H&E	Hématoxyline-Eosine
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colon Cancer
HNE	4-hydroxy-2-nonéol
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène

H₂S	Sulfure d'hydrogène
IL	Interleukine
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor 1
INF	Interféron
INC	Instabilité chromosomique
K-ras	Kirsten-ras
LDL	Lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoprotein)
LDC	Lysine Décarboxylase
LOH	Loss of heterozygosity
MAM	Méthylazoxyméthanol
MMR	Réparation des mésappariements (Mismatch repair)
MDA	Malondialdéhyde
MRS	Gélose Man Rogosa et Sharpe
MSI	Microsatellite Instabilité
NAC	N-Acetyl-Cystéine
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NK	Cellule Natural Killer
ODC	Ornithine Décarboxylase
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactosidase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONAB	Office Nationale d'Aliment de Bétail
P/V	Poids /volume
UFC	Unité formant colonie
P53	Protéine 53
pH	Potentiel d'hydrogène
Rt	Temps de rétention
SDS	Sodium Dédocyl Sulfate
SEM	Erreur Standard à la Moyenne
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloroacétique
TDA	Tryptophane Désaminase
TNFα et γ	Facteur de Nécrose Tumorale alpha et gamma.
TPTZ	Tripyridyl-s-Triazine
V/V	Volume/volume
Wnt	Wingless-integration site

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique moyenne de l'écorce de grenade (Rowayshed et <i>al.</i> , 2013).....	31
Tableau 2: Composition des régimes utilisés durant l'expérimentation.....	41
Tableau 3: Rendement d'extraction des composés phénoliques de l'écorce de grenade....	56
Tableau 4: Valeurs des CE ₅₀ des extraits d'écorce de grenade et des antioxydants standards.....	60
Tableau 5: Diamètres des zones d'inhibitions induits par les deux extraits méthanolique et éthanolique vis-à-vis des souches bactériennes étudiées.....	62
Tableau 6: Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide des extraits méthanolique et éthanolique vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	62
Tableau 7: Poids des organes des rats au moment du sacrifice.....	65
Tableau 8: Pouvoir Réducteur hépatique et colique (mmol/g de tissu) chez les différents groupes de rats après 16 semaines de traitement.....	70
Tableau 9: Oxydation des groupements thiols hépatique et colique (mmol/g de tissu) chez les différents groupes des rats après 16 semaines d'expérimentation.....	72
Tableau 10: Caractères macroscopique, microscopique et biochimique des bactéries isolées de la matière fécale.....	77

Liste des figures

Figure 1:	Anatomie du côlon et du rectum (Nigam et <i>al.</i> , 2019).....	5
Figure 2:	Les différentes couches du colon (Tortora,1994).	6
Figure 3:	Observation microscopique des différentes cellules de la muqueuse colique (Sarniguet ,2016).....	6
Figure 4:	Phases de cancérogénèse : initiation, promotion, progression et métastase (Siddiqui et <i>al.</i> , 2015).....	8
Figure 5:	Métabolisme de 1,2 diméthylhydrazine (DMH) (Heresbach & Heresbach ,2003).....	9
Figure 6:	Mécanisme de cancérogénèse colique (Rahimi et <i>al.</i> ,2012).....	10
Figure 7:	Voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse colorectale (Olivier et <i>al.</i> ,2011)	13
Figure 8:	Métabolisme de 1,2 diméthylhydrazine (DMH) (Rosenberg et <i>al.</i> , 2009).....	14
Figure 9:	Composition du microbiote intestinal (Ouweland & vesterlund, 2003).....	22
Figure 10:	Mécanismes impliqués dans la promotion du cancer colorectal par le microbiote intestinal (Korada et <i>al.</i> , 2015).....	25
Figure 11:	La grenade, définition des différentes parties du fruit (Spilmont, 2013).....	28
Figure 12:	Fruit de grenade (<i>Punica granatum L.</i>) fruit (A) Poudre d'écorce de grenade (B) les grains (C) les écorces de grenade séchées (D) (Ismail et <i>al.</i> , 2012)...	30
Figure 13:	Structure chimique des principaux composés phénoliques de l'écorce de grenade (Bassiri-Jahromi, 2018).....	31
Figure 14:	Fruit de <i>Punica granatum L.</i> (variété Séfri).....	34
Figure 15:	Protocole du suivi et traitement des rats au cours de l'étude.....	43
Figure 16:	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP (Benzie & Strain, 1996).....	48
Figure 17:	Formation d'un chromophore entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) (Dahle et <i>al.</i> , 1962).....	49
Figure 18:	Teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes.....	57
Figure 19:	Chromatogrammes de l'analyse HPLC des extraits de l'écorce de grenade A) Extrait éthanolique B) Extrait méthanolique.....	59
Figure 20:	Pouvoir réducteur des extraits d'écorce de grenade (A) pouvoir réducteur des	

standards (B) (méthode de FRAP).....	60
Figure 21: Evolution du poids corporel et gain de poids des rats pendant 16 semaines d'expérimentation.....	63
Figure 22: Nourriture ingérée (g) et L'apport calorique (Kcal) des différents groupes après 16 semaines.....	64
Figure 23: Teneurs sériques en triglycérides (g/L) chez les différents groupes des rats après 16 semaines.....	66
Figure 24: Teneurs sériques en cholestérol total (g/L) chez les différents groupes de rat après 16 semaines.....	67
Figure 25: Teneurs sériques en C-HDL (g/L) chez les différents groupes de rat après 16 semaines.....	67
Figure 26: Teneurs sériques en C-LDL (g/L) chez les différents groupes de rat après 16 semaines.....	68
Figure 27: Teneurs plasmatique (UI/L) en ASAT et ALAT après 16 semaines d'expérimentation.....	69
Figure 28: Teneurs du pouvoir réducteur total au niveau plasmatique ($\mu\text{mol/L}$) des différents groupes après 16 semaines d'expérimentation.....	70
Figure 29: Teneurs des groupements thiols au niveau plasmatique ($\mu\text{mol/L}$) des différents groupes après 16 semaines d'expérimentation.....	71
Figure 30: Teneurs en peroxydation lipidique plasmatique ($\mu\text{mol/L}$).....	73
Figure 31: Observation microscopique des coupes histologiques des colons de rats après 16 semaines d'expérimentation.....	74
Figure 32: Dénombrement des bactéries d' <i>E. coli</i> et <i>Bacteroides</i> sp. chez les rats soumis aux différents régimes durant les 16 semaines d'expérimentation.....	78
Figure 33: Dénombrement des bactéries de <i>Lactobacillus</i> sp.et <i>Bifidobacterium</i> sp.chez les rats soumis aux différents régimes durant les 16 semaines.....	79

Dédicace

Avant-propos

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des Abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I. Revue bibliographique	
I.1. Le cancer du côlon	4
I.1.1. Prévalence du cancer du côlon dans le monde et en Algérie.....	4
I.1.2. Aperçu sur l'anatomie du côlon	4
I.1.3. Mécanisme de la cancérogénèse colique	7
I.1.3.1. Etapes de la carcinogénèse	7
I.1.3.2. Développement du cancer du côlon	8
I.1.3.2.1. Foyers de Cryptes Aberrantes (FCA).....	9
I.1.3.2.2. Adénomes	10
I.1.3.2.3. Adénocarcinomes	10
I.1.3.3. Mécanisme moléculaire de développement du cancer du côlon.....	11
I.1.3.3.1. Instabilité chromosomique.....	11
I.1.3.3.2. Instabilité des microsatellites (MSI).....	11
I.1.3.3.3. Hyperméthylation de l'ADN	11
I.1.4. Les voies de signalisation.....	11
I.1.4.1. Voie Wnt et le gène Apc	12
I.1.4.2. Voie du TGF (TGF-β)	12
I.1.4.3. Voie de signalisation RAS.....	12
I.1.4.4. Voie de signalisation P53.....	13
I.1.5. Modèles expérimentaux de cancérogénèse colique	13
I.1.6. Consommation alimentaire et risque de cancer du côlon.....	15
I.1.6.1. Consommation des viandes rouges et cancer colique	15
I.1.6.2. Rôle des graisses animales dans la cancérogénèse colique.....	16

I.1.6.3. Les fibres alimentaires et le cancer du côlon	17
I.1.7. Stress oxydant, inflammation et cancer du côlon	18
I.1.7.1. Stress oxydant et cancer du côlon	18
I.1.7.2. Inflammation et le cancer du côlon.....	20
I.1.8. Microbiote intestinal et cancer du côlon.....	21
I.1.8.1. Microbiote intestinal : Description et composition	21
I.1.8.2. Microbiote intestinal, maturation digestive et fonction intestinale	22
I.1.8.3. Dysbiose et cancérogénèse colique	23
I.1.9. Bactéries lactiques probiotiques et cancer du côlon	26
I.1.9.1. Définition du statut « probiotique » d'un microorganisme	26
I.1.9.2. Principales bactéries lactiques probiotiques	26
I.1.9.3. Etat des connaissances sur les mécanismes d'action des bactéries lactiques probiotiques sur le cancer du côlon.....	27
I.2. Généralités sur le grenadier (<i>Punica granatum L.</i>) et la grenade.....	28
I.2.1. Profil botanique du grenadier.....	28
I.2.2. La grenade	28
I.2.2.1. Composition de jus grenade et valeur alimentaire.....	29
I.2.2.2. Vertus des jus de grenade.....	29
I.2.3. L'écorce de grenade	30
I.2.3.1. Composition chimique	30
I.2.3.2. Les utilisations ancestrales de l'écorce de grenade comme remède	32
I.2.3.3. Propriétés biologiques connues de l'écorce de grenade	32
I.2.3.3.1. Propriétés antioxydantes	32
I.2.3.3.2. Propriétés anti-inflammatoires.....	32
I.2.3.3.3. Propriétés anti-tumorales.....	33
I.2.3.4. Toxicité de l'écorce de grenade.....	33

Partie expérimentale

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal : l'écorce de grenade.....	34
II.2. Matériel animal : les rats d'expérience.....	34
II.3. Les souches bactériennes utilisées.....	34
II.3.1. Les souches pathogènes.....	34
II.3.2. Les souches bénéfiques.....	35

II.4. Analyse des composés phénoliques d'écorce de grenade.....	35
II.4.1. Modalités d'extraction des composés phénoliques d'écorce de grenade.....	35
II.4.1.1. Manipulation préparatrice à l'extraction.....	35
II.4.1.2. Calcul du rendement de l'extraction.....	35
II.4.2. Analyse phytochimique de l'extrait d'écorce de grenade.....	36
II.4.2.1. Méthode de dosage des composés phénoliques.....	36
II.4.2.2. Méthode de dosage des flavonoïdes totaux.....	37
II.4.2.3. Analyse des composés phénolique par HPLC.....	38
II.5. Evaluation des activités antioxydante , antimicrobienne in Vitro des extraits phénoliques de l'écorce de grenade.....	38
II.5.1. Détermination du « Ferric reducing antioxydant power » (FRAP).....	38
II.5.2. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	39
II.5.2.1. Réactivation des souches et préparation des pré-cultures.....	39
II.5.2.2. Méthode de diffusion sur gélose.....	39
II.5.2.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).....	40
II.6. Exploration de l'effet in Vivo de l'extrait d'écorce de grenade seul ou associé à des souches bénéfiques sur des lésions cancéreuses du colon chimio-induites.....	41
II.6.1. Régime alimentaire administré aux rats.....	41
II.6.2. Concentrations cellulaires utilisées.....	41
II.6.3. Concentrations d'écorce de grenade utilisé.....	41
II.6.4. Méthode d'induction chimique des lésions précancéreuses du côlon	42
II.6.5. Conditions d'élevage des rats	42
II.6.6. Définition des lots et adaptation des rats à l'expérience.....	42
II.6.7. Les prélèvements de sang et d'organes.....	44
II.6.8. Les diverses méthodes de dosage utilisées.....	44
II.6.8.1. Dosage des triglycérides	44
II.6.8.2. Dosage du cholestérol total.....	45
II.6.8.3. Dosage du cholestérol HDL (C-HDL).....	46
II.6.8.4. Calcul du cholestérol LDL (C-LDL).....	46
II.6.8.5. Détermination du taux de transaminases.....	46
II.6.8.6. Détermination du pouvoir antioxydant total par la technique FRAP.....	47
II.6.8.7. Dosage des groupements thiols.....	48

II.6.8.8. Détermination des TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances).....	49
II.6.9. Technique d'histologie du côlon	50
II.6.10. Recherche et dénombrement de quelques bactéries représentatives du microbiote Intestinal.....	51
II.6.10.1. Recherche et dénombrement d' <i>Escherichia coli</i>	51
II.6.10.2. Dénombrement de <i>Bacteroides</i> sp.....	52
II.6.10.2. Dénombrement de <i>Lactobacillus</i> sp.....	52
II.6.10.4. Dénombrement des <i>Bifidobacterium</i> sp.....	53
II.6.10.5. Tests d'identification des bactéries étudiées	53
II.7. Traitement statistique des résultats.....	55
Chapitre III. Résultats	
III.1. Le rendement d'extraction des polyphénols d'écorce de grenade.....	57
III.2. Teneurs en substances phénoliques de l'extrait d'écorce de grenade.....	57
III.3. Profil chromatographique des extraits phénoliques d'écorce de grenade.....	58
III.4. Activité antioxydante in Vitro de l'extrait phénolique d'écorce de grenade.....	59
III.5. Activité antimicrobienne des extraits phénoliques d'écorce de grenade.....	61
III.5.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par diffusion sur gélose.....	61
III.5.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide(CMB)	61
III.6. Effet in Vivo de l'écorce de grenade (<i>Punica granatum</i> L.) combinée ou non à des souches bénéfiques sur les lésions précancéreuses chimio-induites chez le rat sous régime hyper-gras.....	63
III.6.1. Poids corporel.....	63
III.6.2. Nourriture ingérée et l'apport calorique.....	64
III.6.3. Evaluation de poids des organes.....	64
III.7. Effets in Vivo de l'extrait phénolique d'écorce de grenade associé ou non à des souches bénéfiques sur certains paramètres sériques chez le rat sous régime hyper-gras.	65
III.7.1. La triglycéridémie.....	65
III.7.2. Les concentrations en cholestérol total (CT).....	66
III.7.3. Le cholestérol HDL (C-HDL).....	67
III.7.4. Le cholestérol LDL (C-LDL).....	68
III.7.5. Teneurs sériques en transaminases et transférases.....	68
III.8. Effets in Vivo de l'extrait phénolique d'écorce de grenade associé ou non à des souches bénéfiques sur le stress oxydatif chez le rat sous régime hyper-gras.....	69

III.8.1. Pouvoir réducteur total.....	69
III.8.1.1. Pouvoir réducteur plasmatique.....	69
III.8.1.2. Le pouvoir réducteur total tissulaire.....	70
III.8.2. Concentrations en Thiols.....	71
III.8.2.1. Concentrations en Thiols plasmatiques.....	71
III.8.2.2. Concentrations en Thiols tissulaires.....	71
II.8.3. Niveau des TBARS.....	72
III.8.3.1. Teneur en TBARS plasmatique	72
III.9. Aspect des lésions précancéreuses chimio-induites en tant que modèle de cancer expérimental du côlon	73
III.10. Effets in Vivo de la poudre d'écorce de grenade associée ou non à des souches bénéfiques sur le microbiote intestinal.....	75
III.10.1. Identification des bactéries recherchées	75
III.10.2. Dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> et des <i>Bacteroides</i> sp.....	77
II.10.3. Dénombrement des <i>Lactobacillus</i> sp. et des <i>Bifidobacterium</i> sp.....	78
Chapitre IV. Discussion	80
Conclusion	97
Références bibliographiques	99
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

Le cancer du côlon constitue un problème majeur de santé publique dans le monde en raison de sa fréquence et sa gravité. Il occupe la 2^{ème} position des cancers chez les femmes après celui du sein et la 3^{ème} chez les hommes dans le monde après le cancer du poumon (Torre et al., 2015). Il représente ainsi la 3^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde (Jemal et al., 2011). Comme les autres types de cancer, la résistance à la mort cellulaire programmée et la prolifération cellulaire incontrôlée sont les principales caractéristiques du cancer du côlon (Daniluk, 2012). Les causes de cette pathologie sont complexes, probablement multifactorielles, elles regroupent les facteurs environnementaux, génétiques, hormonaux ainsi que le mode de vie et le type alimentaire.

Il est admis largement que l'alimentation déséquilibrée est considérée comme l'une des causes majeures dans la survenue du cancer colorectal puisqu'on lui attribue plus d'un tiers des cas de cancers (Cohen et al., 2014). L'étude des conséquences d'une alimentation riche en lipides sur les risques du développement d'un cancer colorectal a fait l'objet de nombreux travaux (Järvinen et al., 2001; Srihari et al., 2008). Certaines études affirment que les rats nourris avec un régime riche en graisses sont plus sensibles à l'induction de tumeur du côlon par le 1,2 diméthylhydrazine (DMH) (Xu et al., 2007). Cette sensibilité est due aux apports énergétiques alimentaires élevés et plus particulièrement lipidiques qui engendrent une augmentation de la production des espèces réactive de l'oxygène (ERO) entraînant ainsi un stress oxydatif exaspéré, impliqué dans la génération des dommages à l'ADN (Trindade de Paula et al., 2016).

Récemment, de plus en plus d'études soulèvent l'implication d'un nouveau facteur environnemental dans l'étiologie du cancer colorectal, ce facteur est étroitement associé à l'individu, et le caractérise dès la naissance ; il s'agit du microbiote intestinale. Le rôle de cette microflore est largement établie via des processus impliquant l'inflammation, les dommages à l'ADN, l'apoptose ou encore la production de toxines mutagéniques de la dysbiose intestinale (Collins, 2011). Pour approfondir la compréhension des mécanismes sous-jacents conduisant à la génèse du cancer, plusieurs modèles expérimentaux sont utilisés pour explorer les voies d'induction de la cancérogénèse colique, parmi ces modèles les rats Wistar chimio-induits par des substances pro-cancérogènes comme le DMH ou son métabolite secondaire : l'azoxyméthane (AOM). En effet, le DMH est métabolisé dans le foie en AOM, qui est ensuite transformé en méthylazoxyméthanol. Ce dernier métabolite donne naissance à

des ions méthyl-carbonium : un électrophile capable de provoquer des mutations par mésappariements au niveau de l'ADN. Ils engendrent aussi des foyers de cryptes aberrantes, considérés comme de bons marqueurs pré-néoplasiques (Jucá et al., 2014).

D'autre part, le DMH provoque la production des espèces radicalaires de l'oxygène induisant un déséquilibre de la balance antioxydant/proxydant et l'accumulation des dommages cellulaires essentiellement les altérations au niveau de l'ADN (Thangaraj et al., 2018). Cette molécule est aussi impliquée dans la dysbiose du microbiote intestinal associée au cancer colique. A la lumière de ces données, la restauration à la fois du déséquilibre oxydatif et du microbiote intestinal constitue actuellement une stratégie très importante dans la prévention de la progression du cancer du côlon.

Cette stratégie est basée sur l'utilisation des bactéries bénéfiques tels que les probiotiques ainsi que les biomolécules d'origine naturelle. Parmi les bio-ressources naturelles riches en molécules bioactives, le fruit du grenadier (*Punica granatum* L.) est l'un des plus anciens fruits comestibles connus, il est cultivé principalement dans la région méditerranéenne, et est utilisé depuis des siècles pour traiter de nombreuses maladies telles que les infections parasitaires et microbiennes, ulcères, diarrhée, hémorragie et dysentérie (Reddy et al., 2004; Johanningsmeier & Harris, 2011). Il est l'un des fruits les plus riches en composés phénoliques comme les tannins et les anthocyanines (Zaouay et al., 2012).

La consommation de ce fruit génère des quantités considérables de sous-produits. En effet, les écorces de grenade sont souvent rejetées sans valorisation. Ces derniers présentent diverses activités biologiques telles que la neutralisation des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne et la diminution des risques de maladies cardiovasculaires, cérébrovasculaires et certains cancers (Mena et al., 2011 ; Ahmed et al., 2017). Cette écorce peut être considérée comme une source prometteuse pour la production des extraits riches en antioxydants naturels à visée thérapeutique et alimentaires. De ce fait, diverses études s'intéressent à trouver des méthodes de valorisation de ces écorces et à déterminer leurs vertus thérapeutiques.

D'autre part, les probiotiques sont largement vantés pour leurs effets bénéfiques sur la santé, ainsi que leur impact sur le cancer du côlon. En effet des études ont montré une relation entre la consommation des produits laitiers fermentés contenant des *Lactobacilles* ou des *Bifidobactéries* et l'incidence du cancer (Boutron et al., 1996 ; Sivamaruthi et al., 2020). Ces deux éléments, l'écorce de grenade et les probiotiques, s'ils sont pris en considération, ils

peuvent être des facteurs clés dans les stratégies préventives qui visent la modulation simultanée des désordres oxydatifs et la dysbiose intestinale. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à évaluer l'effet combiné de ces deux facteurs et à l'estimation de l'impact de ces derniers in Vivo sur les altérations précancéreuses coliques. Dans cette optique, et plus particulièrement celui concernant la prévention de la carcinogénèse colique expérimentale induite par DMH. La présente étude consiste à :

- ✓ Extraire, quantifier et identifier les composés phénoliques de l'écorce de grenade.
- ✓ Evaluer les propriétés antioxydantes et antibactériennes des extraits d'écorce de grenade.
- ✓ Développer une approche nutritionnelle préventive basée sur le concept probiotique/écorce de grenade à l'égard des :
 - Désordres biochimiques.
 - Stress oxydatif.
 - Dysbiose du microbiote intestinal.
 - Lésions histologiques coliques.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Revue bibliographique.

I.1. Le cancer du côlon

I.1.1. Prévalence du cancer du côlon dans le monde et en Algérie

Le cancer colorectal est une des principales causes de mortalité dans le monde entier dont l'incidence a augmenté rapidement ces dernières années (Uhry *et al.* , 2013). Il occupe la 2^{ème} place des cancers chez la femme (614.000 cas, 9.2% du total) et la 3^{ème} chez l'homme (746.000 cas, 10% du total) (Stewart & Wild, 2014) avec environ 200.000 des nouveaux cas et par an entre 2002 et 2012 (Brody, 2015). Les taux les plus élevés sont enregistrés dans les pays d'Europe, d'Amérique du Nord, en Australie et en Nouvelle-Zélande et plus récemment au Japon. Tandis que, les taux les plus faibles sont relevés en Afrique de l'Ouest (Cunningham, *et al.*, 2010).

En Algérie, le cancer colorectal se situe en deuxième position chez les deux sexes, après le cancer du sein chez la femme et derrière celui du poumon chez l'homme. Son incidence selon le registre du cancer de Sétif entre 2008 et 2014 est de 13 nouveaux cas pour 100.000 habitants chez l'homme et de 10.7 pour 100.000 habitants annuellement chez la femme. Le taux de mortalité en Algérie par ce cancer est classé en 2^{ème} à raison de 1005 décès chez les hommes et de 1011 décès chez les femmes selon les statistiques de l'Institut National de la Santé Publique Algérienne (INSP, 2012).

I.1.2. Aperçu sur l'anatomie du côlon

Le côlon humain est un organe musculaire d'environ 1.5 m de long (Saladin, 2014). Il constitue la partie terminale du tractus gastro-intestinal, s'étend du caecum jusqu'au rectum. Sa fonction est essentiellement de réabsorber le maximum de liquide provenant du bol alimentaire pour concentrer, former et stocker les matières fécales, résidus de la digestion des aliments. Il se divise en trois parties :

- La première est le côlon droit, qui débute avec le cæcum auquel est accolé l'appendice, continue par le côlon ascendant et se termine à l'angle droit, sous le foie.
- La seconde partie est le côlon transverse qui s'étend de l'angle droit à l'angle gauche ; il est voisin de l'estomac.
- La troisième partie est le côlon gauche, qui commence à l'angle gauche, continue par le côlon descendant et se termine par le côlon sigmoïde qui se situe autour et en arrière

de la vessie. Le rectum fait suite au côlon sigmoïde et débute à la charnière recto sigmoïdienne pour se terminer par le canal anal. Il se divise en haut, moyen et bas rectum (fig.1). Le siège le plus fréquent du cancer est le côlon gauche, particulièrement la charnière recto sigmoïdienne, puis le rectum. Mais toutes les parties du côlon peuvent être atteintes (**Mac Farlane & Stover, 2007**).

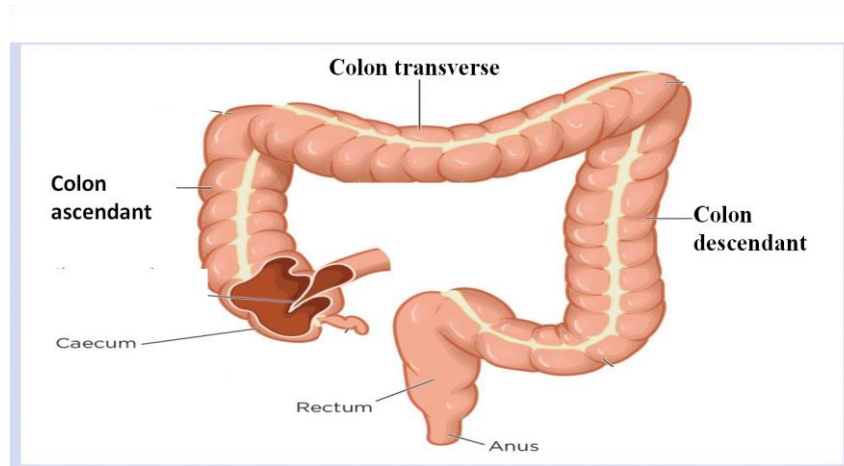


Figure 1: Anatomie du colon et du rectum (**Nigam et al., 2019**).

La paroi du côlon est constituée de quatre tuniques, caractéristiques du tube digestif reliées entre elles par un tissu conjonctif (**fig.2**). Chacune de ces couches est capable de fonctionner indépendamment des autres et sont ; de la lumière vers la périphérie (**Mac Farlane & Stover, 2007**) :

Muqueuse: est composée d'un épithélium de revêtement cylindrique reposant sur un tissu conjonctif (le chorion) qui s'invagine dans la muqueuse en cryptes de Lieberkühn. Cet épithélium est composé de cellules épithéliales jointives qui assurent l'étanchéité de l'organe (**Krstic, 1991**). Les glandes de Lieberkühn sont constituées de plusieurs types de cellules : les cellules caliciformes, qui sécrètent le mucus intestinal, les cellules absorbantes (ou colonocytes), les cellules souches, et les cellules endocrines, qui permettent le renouvellement cellulaire (Stevens & low, 1992) (**fig.3**).

Sous-muqueuse : est constituée de tissu conjonctif et contient le plexus nerveux de Meissner ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques pour la muqueuse.

Muscleuse : Constituée de fibres musculaires lisses et de fibres musculaires striées, permet la contraction de la paroi colorectale.

Séreuse : revêtement externe du côlon, composée par un tissu conjonctif tapissé par un épithélium simple.

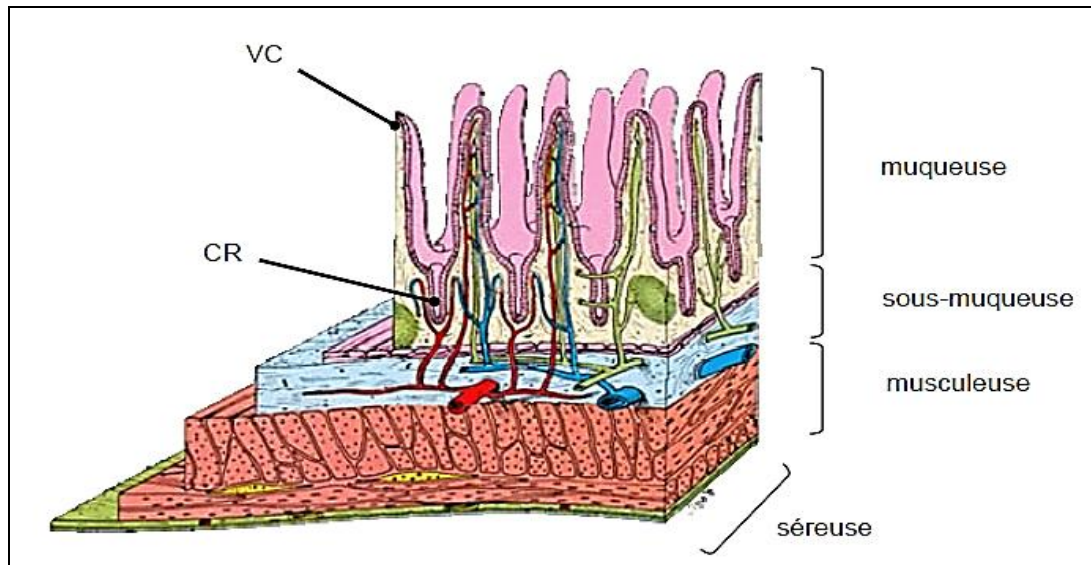


Figure 2: Différentes couches du colon (Sarniguet ,2016).

VC= valvules conniventes; CR= cryptes.

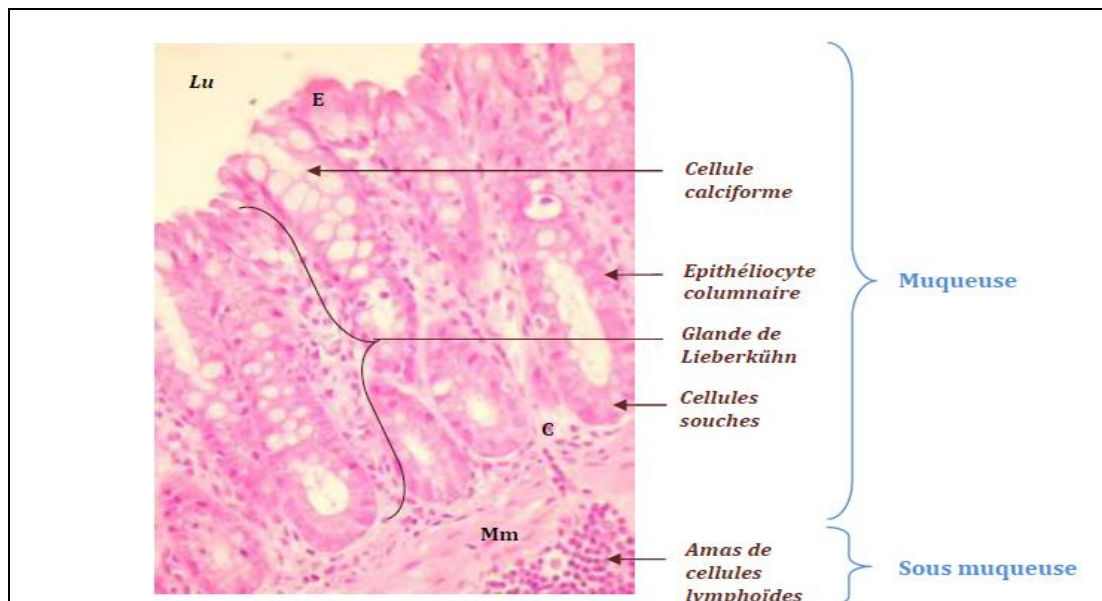


Figure 3 : Observation microscopique des différentes cellules de la muqueuse colique (x 400 après coloration Hématoxyline-Eosine (H&E) (Sarniguet, 2016).

Lu : lumière intestinale, E : épithélium, C : chorion, Mm : musculaire muqueuse

I.1.3. Mécanismes de la cancérogénèse colique

I.1.3.1. Etapes de la carcinogénèse

Le cancer du côlon est une tumeur siégeant dans la région du côlon, caractérisé par une prolifération anormale de cellules dans le gros intestin et par la formation de carcinomes glandulaires ou adénocarcinomes. La tumeur pénètre alors en profondeur et peut atteindre successivement les différentes couches de la muqueuse colique jusqu'au péritoine qui l'enveloppe, puis les ganglions lymphatiques (**Kinzler et al., 1996**). On dénombre quatre phases suivantes (**fig.4**)

• **Phase d'initiation :**

Cette phase résulte d'une interaction entre un agent cancérigène (physique, chimique, et biologique) et le génome de la cellule. Les altérations génétiques peuvent entraîner une dérégulation des voies de signalisation biochimiques associées à la prolifération cellulaire, à la survie et à la différenciation, qui peut être influencé par un certain nombre de facteurs, y compris le taux et le type de métabolisme cancérigène et la réponse de la réparation de l'ADN (**Siddiqui et al., 2015**).

• **Phase de promotion :**

Durant cette phase des événements non génotoxiques conduisent à la prolifération des cellules initiées et à la formation de foyers de cryptes aberrantes. Cette prolifération est probablement due à une hypo-méthylation de l'ADN. Puis la mutation de gène *K-ras*, gène est essentielle à la signalisation cellulaire, mais il devient oncogène lorsqu'il est altéré, entraîne une surexpression de la cyclo-oxygénase (COX-2), enzyme de synthèse des prostaglandines. Cela entraîne une réaction inflammatoire, conduisant à la formation d'une lésion précancéreuse réversible (**Fearon, 2011**).

• **Phase de progression :**

La progression est la dernière étape de la transformation néoplasique, où se produisent des changements génétiques et phénotypiques et une prolifération cellulaire. Cela implique une augmentation rapide de la taille de tumeur, où les cellules peuvent subir d'autres mutations avec un potentiel invasif et métastatique (**Siddiqui et al., 2015**).

• **Phase d'invasion :**

A ce stade les cellules malignes transformées se détachent alors de l'épithélium, traversent la membrane basale et envahissent le mésenchyme sous-jacent. Les métalloprotéases sécrétées par les cellules stromales favorisent l'invasion. Il y a donc dissémination des cellules tumorales par la voie sanguine et le système lymphatique, et formation des métastases qui vont atteindre d'autres organes (Weinberg, 1996).

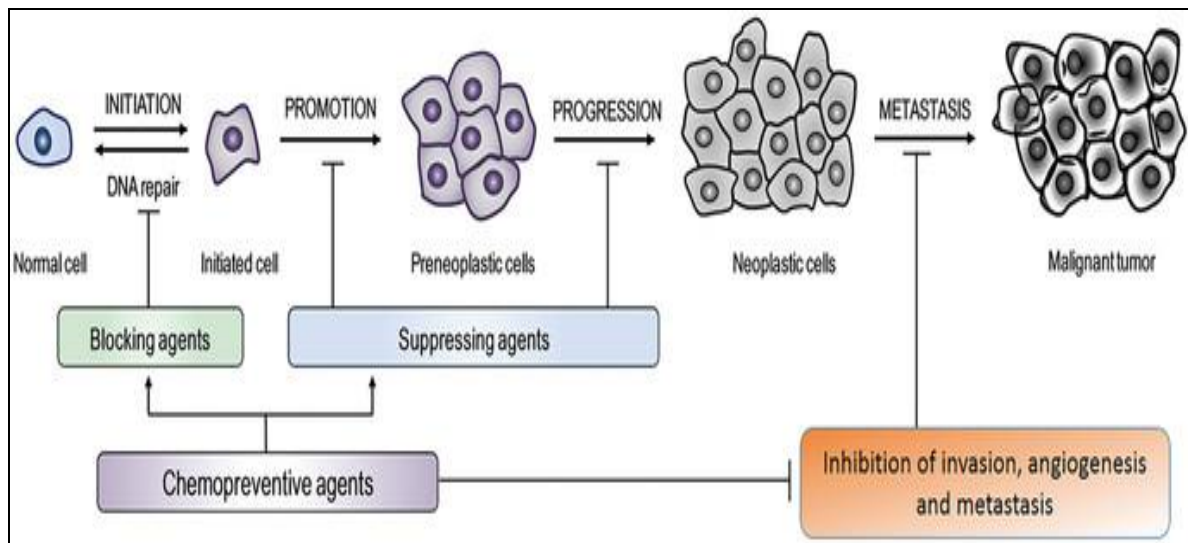


Figure 4: Phases de cancérogénèse: initiation, promotion, progression et métastase
(Siddiqui et al., 2015).

I.1.3.2. Développement du cancer du côlon

La cancérogénèse colorectale est un processus multi-étapes fait de modifications génétiques et moléculaires, induisant des bouleversements histologiques, menant à la formation d'un adénome puis d'un adénocarcinome. Ce processus consécutif de cancérogénèse est lent et implique différentes voies de signalisation exhibant des possibilités de développer des stratégies moléculaires ciblées préventives et curatives (Thun et al., 2002). En effet, la première étape du développement du cancer colorectal est l'apparition d'une hyperprolifération de l'épithélium colique. Au plan morphologique, la première anomalie détectable est :

I.1.3.2.1. Foyers de Cryptes Aberrantes (FCA)

En 1987, Bird découvre des lésions dans le côlon de rongeurs ayant reçu un carcinogène quelques semaines auparavant. Ce sont des foyers de cryptes aberrantes (FCA). Ces FCA sont considérés comme l'étape visible la plus précoce de la carcinogenèse colique. Il existe de nombreuses données expérimentales qui ont confirmé cette observation. En effet, **Tkayama et al. (1998)** ont démontré que des lésions semblables apparaissent fréquemment sur la muqueuse du côlon de patients atteints de cancer du côlon (**fig.5**). Il s'agit de crypte au calibre élargi entourés d'un épithélium épaissi avec une mucosécrétion diminuée. Selon **Heresbach & Heresbach.(2003)**, il existe deux types de FCA : hyperplasiques, qui présentent un aspect apical branché des cryptes, celles-ci ayant un épithélium de surface de leur partie supérieure d'aspect festonné ou dentelé et en outre, des FCA dysplasiques caractérisés par une stratification des noyaux, des mitoses dans les deux tiers supérieurs des cryptes et une raréfaction des cellules caliciformes (**Jucá et al., 2014**). Par ailleurs, ces lésions dysplasiques sporadiques présentent moins souvent des mutations sur le gène Adenomatous polyposis coli (Apc) et plus fréquemment des mutations K-ras et une hyperméthylation, comparées aux foyers de cryptes aberrantes dysplasiques des polyposes adénomateuses familiales (Les mutations Apc restent cependant plus fréquentes que dans les FCA hyperplasiques).

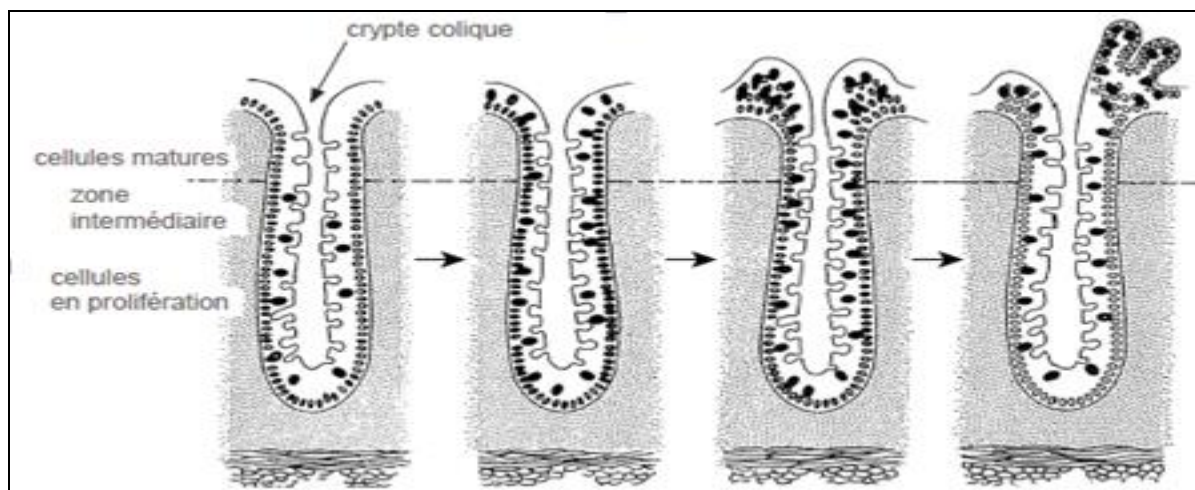


Figure 5: Foyers de cryptes aberrantes (Heresbach & Heresbach ,2003)

I.1.3.2.2. Adénomes

Ils sont des lésions néoplasiques constitués par une prolifération épithéliale qui peut être strictement bénigne ou qui peut présenter des altérations dysplasiques modérés ou sévère et parfois des carcinomes, histologiquement, l'organisation mondiale de santé (OMS) subdivise les adénomes en trois types à savoir tubuleux, vilieux, et tubulovilleux. Les adénomes tubuleux sont des lésions arrondies, mesurant de 0.5 à 2 cm de diamètre reposé sur un pied de muqueuse normale leur surface ressemble à une série de tubes. Ils se retirent facilement lors d'une coloscopie (Brenner et al., 2010), tandis que les adénomes vilieux (5% des polypes adénomateux) présentent un aspect en touffes d'algues, un diamètre de 1 à 5 cm. Finalement, les adénomes tubulovilleux (20 % des polypes adénomateux) qui sont des lésions surélevées sur une base de muqueuse normale présentant à la fois des caractéristiques de l'adénome tubuleux et vilieux (Torlakovic et al., 2003)(fig.6).

I.1.3.2.3. Adénocarcinomes

Constituent la plupart des cancers colorectaux. Au début, le développement d'un carcinome est superficiel, strictement intra-épithélial puis intra-muqueux sans franchissement de la lame basale est désigné sous le terme *in situ* (Neuville, 2010). Puis lorsque l'adénocarcinome dépasse la musculaire muqueuse on parle d'adénocarcinome infiltrant. Le carcinome s'étend ensuite progressivement en profondeur dans la paroi colique, la sous-muqueuse, la musculuse, puis dans la sous-séreuse et la séreuse. A un stade tardif de bouleversement du cancer, les cellules malignes génétiquement instables accumulent les mutations et certains clones acquièrent la capacité de métastaser (Siddiqui et al., 2015).

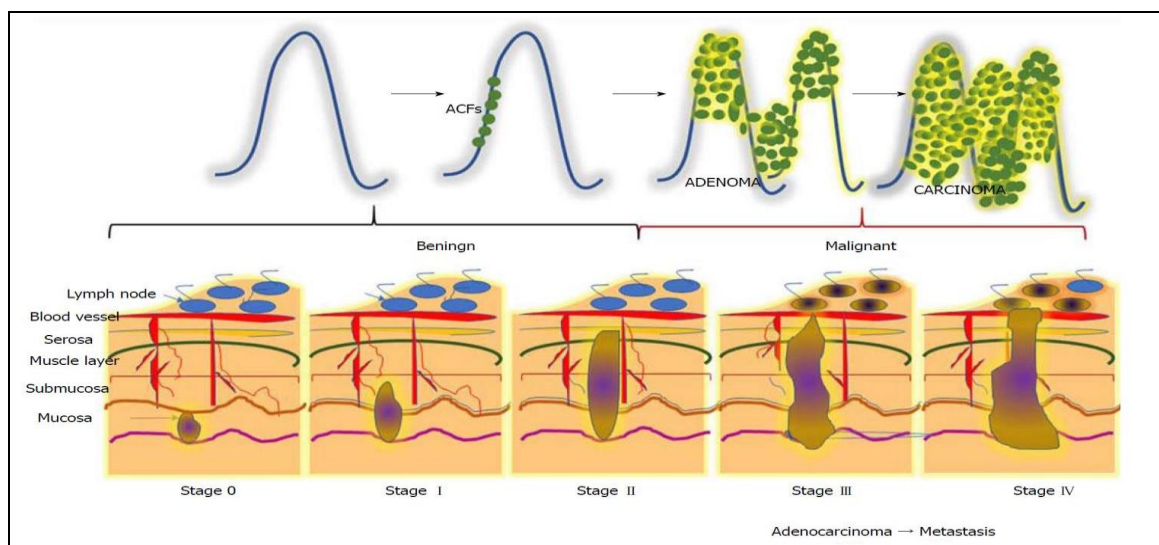


Figure 6 : Développement du cancer du côlon (Rahimi et al .,2012).

I.1.3.3. Mécanisme moléculaire de développement du cancer du côlon

Le cancer du côlon peut provenir d'un ou d'une combinaison de trois mécanismes, à savoir l'instabilité chromosomique, instabilité de microsatellite et hyperméthylation des îlots.

I.1.3.3.1. Instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique (INC) est présentée dans environ 85 % des cas sporadiques de cancer colorectal. Elle est observée de façon caricaturale au cours de la Polypose Adénomateuse Familiale (**Paillas, 2011**), cette altération est caractérisée par une perte du matériel chromosomique, qui entraîne une inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeur, tels que le gène *Apc* sur le bras chromosomique 5q, ou *TP53* sur le bras 17p (**Viguiet et al., 2003**).

I.1.3.3.2. Instabilité des microsatellites

Elle est présentée dans environ 15 % des cancers du côlon sporadique et dans 95% des cas dans le syndrome de Lynch ou syndrome Hereditary Non Polyposis Colon Cancer (HNPCC). Ces cancers sont appelés cancer microsatellite instabilité (MSI) (**Paillas, 2011**). En effet, l'instabilité des microsatellites se caractérise par un remaniement des locus microsatellites liée à de défaut du système de réparation, des erreurs produites au cours de la réplication de l'ADN système *Mismatch repair* (MMR) (**Nojadeh et al., 2018**). La déficience du système MMR conduit à l'accumulation des mutations qui vont inactiver de nombreux gènes aboutissant à la transformation de la cellule, le gène pro-apoptotique *BAX*, le gène du récepteur de type II *TGF β* et les facteurs de transcription *TCF-4* ou *E2F4* sont souvent retrouvés mutés dans les cancers MSI (**Lacave et al., 2005**).

I.1.3.3.3. Hyperméthylation de l'ADN

Concerne 20 à 30 % des tumeurs sporadiques. Cette voie entraîne l'inactivation de nombreux gènes suppresseurs de tumeur par hyperméthylation de leurs promoteurs. Parmi les gènes suppresseurs inactivés, on rencontre le gène *MLH1* (gène du MMR) (**Roper et al., 2017**).

I.1.4. Les voies de signalisation

Au cours de la cancérogénèse colorectale, de nombreuses voies de signalisations sont impliquées par une activation inadéquate du signal mitotique, ce qui aboutit à une prolifération incontrôlée et donc la transformation maligne.

Quatre voies de signalisations sont fréquemment altérées : la voie de signalisation Wnt/APC, TGF- β , K-Ras, et la voie de P53 (**Olivier et al., 2011**)(fig.7).

I.1.4.1. Voie Wnt et le gène Apc

L'altération de la voie Wnt est la caractéristique principale des cancers du côlon. Cette voie de signalisation est impliquée dans le phénotype des cancers colorectaux Loss of heterozygosity (LOH) et MSI avec une fréquence d'activation proche de 80% (Liu et al. 2000). Le gène APC est un partenaire essentiel du processus de cancérogenèse colorectale, il joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (**Kinzler & Vogelstein, 1996**). Cependant, sa mutation a conduit à l'accumulation cytosolique de la β -caténine, qui après sa translocation vers le noyau induit la transcription d'un certain nombre du gène favorisant la prolifération cellulaire (**Korinek Barker et al., 1997**). Ces mutations entraînent aussi une déstabilisation du complexe multi protéique contenant l'Axine 1, la β -caténine et GSK3 (**Martinez et al., 2005**).

I.1.4.2. Voie du TGF (TGF- β)

Le TGF- β joue un rôle central dans la régulation de la physiologie normale du colon mais aussi dans le développement du cancer colorectal et de son progression métastatique. Ce facteur de croissance présente un effet paradoxal, car il inhibe la prolifération de cellules épithéliales normales et de cellules tumorales aux stades précoces de la maladie, tout en causant un effet opposant efficace sur les cellules malignes et stromales aux stades avancés de la tumorigénèse (**Wakefield & Hill, 2013**). Cette voie de signalisation est impliquée dans les cancers colorectaux par plusieurs mécanismes : des mutations germinales sur SMAD4 ou BMPR1A prédisposent aux polyposes juvéniles, SMAD4 est également inactivé par perte d'hétérozygotie dans 20 à 30% des cas (**Padoue & Massagué, 2009**).

I.1.4.3. Voie de signalisation RAS

La protéine RAS joue le rôle d'un interrupteur au sein des voies de signalisations et oscille entre deux états : un état actif où elle est liée au Guanosine Tri-Phosphate, ce qui permet transitoirement l'interaction de RAS avec d'autres molécules intracellulaires effectrices et l'activation de différentes voies de signalisations et un état inactif où elle est liée au Guanosine Di-Phosphate. La voie de signalisation RAS est dérégulée dans de nombreux cancers dont le cancer colorectal, cette dérégulation peut être induite soit par une activation de récepteurs membranaires tels que l'EGFR, ou également suite à la survenue des mutations

somatiques, notamment au niveau des gènes codant pour la protéine RAS (Lièvre & Laurent-Puig, 2010).

I.1.4.4. Voie de signalisation P53

P53 est un gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 17 (Tsang *et al.*, 2014) P53 a été défini comme le « gardien du génome » car il code un facteur de transcription qui contrôle la transcription de certains gènes inclus dans différents processus, y compris la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose et le métabolisme en réponse à une variété de signaux du stress (Levine *et al.*, 1997). L'altération de P53 est le marqueur des tumeurs humaines, et sa mutation est associée à la progression du cancer du côlon sporadique (Nguyen & Duong, 2018).

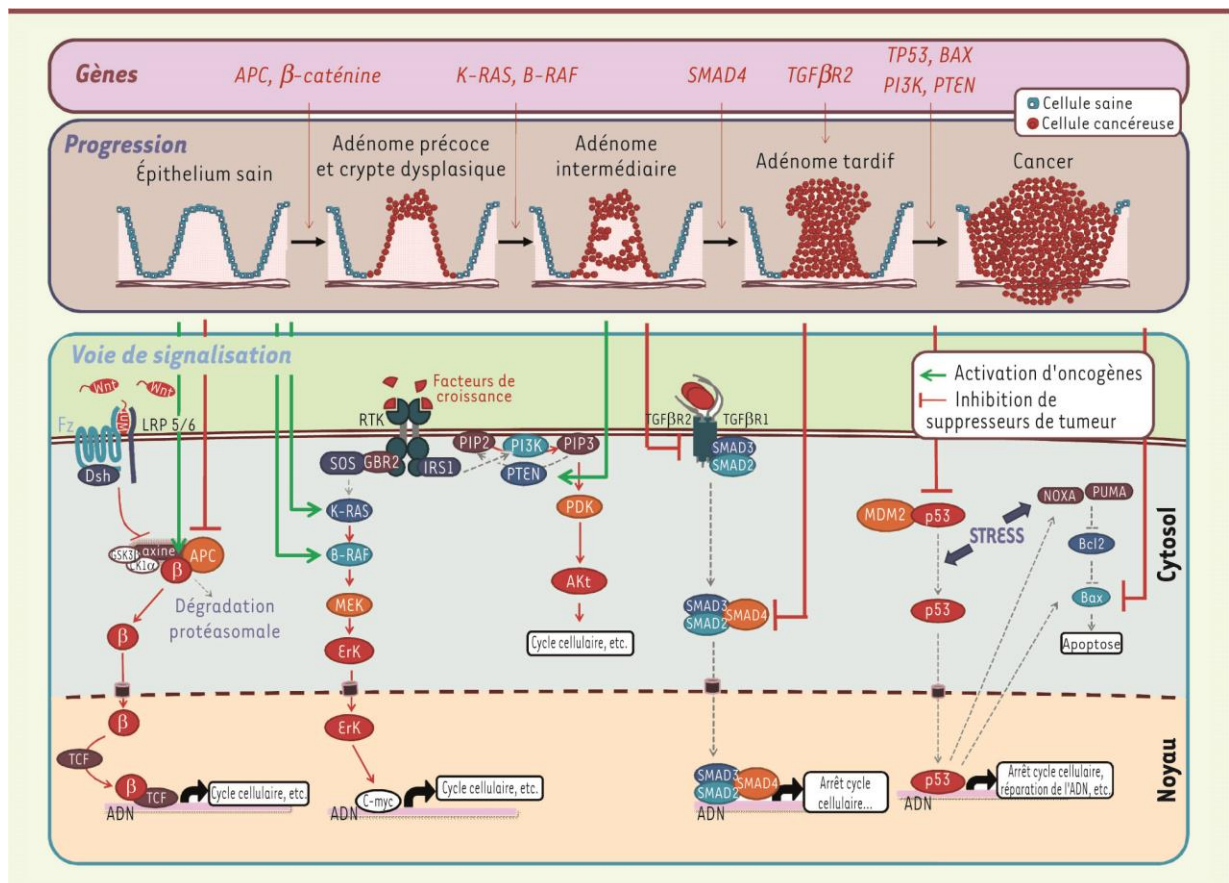


Figure 7 : Mécanisme moléculaire de la cancérogénèse colorectale (Olivier *et al.*, 2011)

I.1.5. Modèles expérimentaux de cancérogénèse colique

Il existe plusieurs modèles animaux permettant d'étudier l'effet des agents nutritionnels préventifs ou au contraire promoteurs sur la cancérogénèse colorectale. Deux types de modèles animaux permettant d'accélérer l'apparition des tumeurs : les modèles chimio-

induits, auxquels, un cancérigène chimique est injecté ; et les modèles génétiques, comme les souris Min, mutées sur le gène Apc, qui développent spontanément des tumeurs en quelques semaines.

• Rats induits par 1,2 Diméthylhydrazine et Azoxymethane

Le modèle animal le plus exploité dans les études de chimio-prévention du cancer du côlon utilise des dérivés de DMH et de son métabolite, l'AOM. Dans la plupart des études, ils sont injectés à des rats tels que rats Wistar, Sprague-Dawley ou Fisher F344, plus rarement à des souris. Ces animaux reçoivent des injections d'un cancérigène chimique, afin d'induire l'apparition de lésions précancéreuses, et de tumeurs (Femia et al., 2008). En effet, le DMH est un cancérigène indirect qui nécessite une activation métabolique au niveau du foie pour donner l'AOM, qui est ensuite transformée en méthylazoxyméthanol (MAM). Le MAM est alors conjugué en acide glucuronique par des enzymes de conjugaison. Ce complexe hydrophile est excrété vers le côlon via la voie des acides biliaires. Il peut alors être déconjugué grâce à la β -glucuronidase bactérienne, libérant ainsi le MAM qui se transforme spontanément en ion diazonium réabsorbé par les colonocytes (fig.8). Ce dernier, agit sur le génome des cellules coliques et provoque ainsi le processus de cancérisation (Mario et al., 2014), qui se caractérise par le développement des foyers de cryptes aberrantes (FCA).

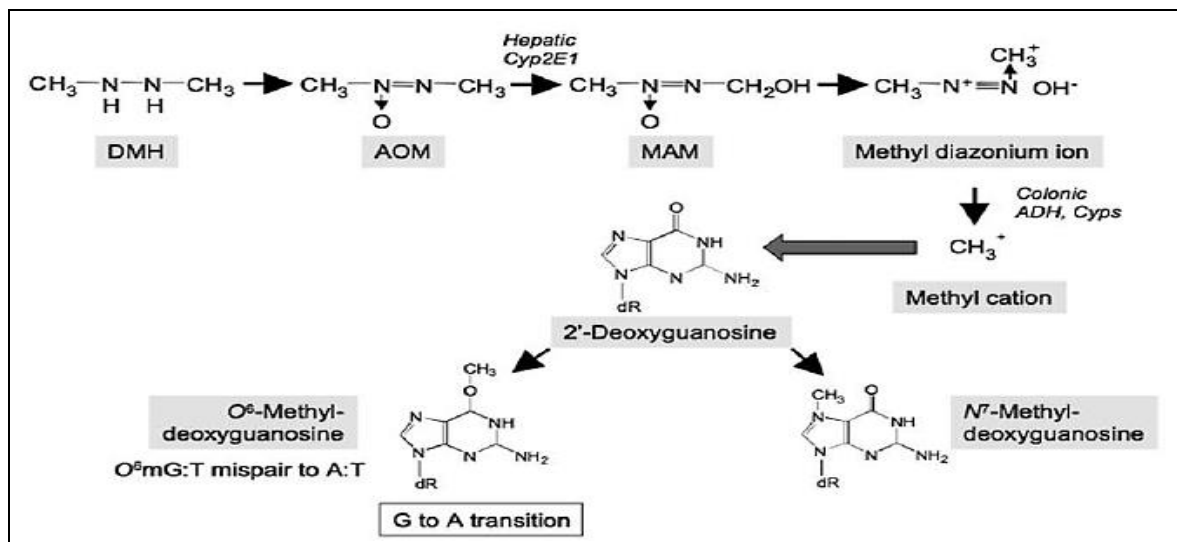


Figure 8: Métabolisme de 1,2 diméthylhydrazine (Rosenberg et al., 2009).

I.1.6. Consommation alimentaire et risque de cancer du colon

L'alimentation est considérée comme un facteur essentiel dans le développement du cancer colorectal (**Morois & Boutron-Ruault, 2012**). Elle peut apporter des facteurs cancérigènes par eux-mêmes ou par leurs métabolites mais elle peut aussi être la source de facteurs protecteurs. Des appréciations confirmées par le « World Cancer Research Fund » font état d'environ 30 % des cancers humains liés à l'alimentation (**WCRF, 2007**). Le cancer colorectal est l'un des cancers dont le développement est le plus clairement lié à l'alimentation. En effet, des études épidémiologiques montrent que des facteurs de l'alimentation tels que la quantité de lipides, de viande et d'alcool, ainsi que l'ingestion d'un excès de calories sont associés à un risque augmenté de cancer colique (**Morois & Boutron-Ruault, 2012**). D'autres facteurs comme les légumes, les fruits, le calcium, les fibres alimentaires contenant des pentosanes, et certains glucides, sont associés à un risque diminué. Par exemple, dans certaines études, la mortalité par cancer du côlon est inversement proportionnelle à la consommation de blé et de céréales (**Riboli et al., 1996**).

I.1.6.1. Consommation des viandes rouges et cancer colique

Le rôle de la consommation des viandes rouges dans le développement du cancer colorectal (CCR) a fait l'objet de plusieurs études (**Bastide et al ., 2011 ;Turner et Lloyd, 2017**). De nombreuses hypothèses mécanistiques ont été suggérées pour expliquer l'association entre la consommation des viandes rouges et le risque du cancer colorectal. Plusieurs composants de la viande, y compris ceux issus de la transformation de la viande, les amines hétérocycliques, N-nitrosés et le composé endogène, le fer héminique, ces composés sont potentiellement cancérigènes peuvent induire des altérations de L'ADN (**Kruger & Zhou ,2018**). Celles-ci sont aussi liées au fer héminique qui joue un rôle essentielle dans le processus de la cancérogenèse colique via la formation endogène de nitrosamines et d'aldéhydes cytotoxiques et génotoxiques et par la peroxydation lipidique (**Bastide et al., 2011**).

Dans une étude in Vitro menée par **Sesink et al. (1999)** a rapporté que l'hémine provoque une hyper-prolifération des cellules épithéliales du côlon chez le rat. Une autre étude prospective de cohorte sur la consommation de viande et le risque de cancer colorectal, ces auteurs ont confirmé qu'une augmentation quotidienne de la ration journalière de 100 g de la viande rouge est associée à une augmentation significative du risque de CCR de 12 à 17%

(Sandhu et al., 2001). Aussi, Bernstein et al. (2015) ont indiqué dans une méta-analyse de deux grandes cohortes que la viande transformée était positivement associée au risque du cancer du côlon. Il a été dévoilé que l'augmentation de la formation de composés N-Nitrosés dans les fèces des personnes saines est corrélée à la consommation des viandes rouges et de charcuteries (Joosen et al., 2009).

I.1.6.2. Rôle des graisses animales dans la cancérogénèse colique

La consommation des aliments riche en graisse a fait l'objet d'une attention considérable en tant que facteur de risque dans l'étiologie du cancer du côlon (Abraham, 2012). Depuis de nombreuses années, les chercheurs ont établi que l'excès alimentaire (en quantité) favorise le développement et l'évolution du cancer du côlon (WCRF, 2007). Des études épidémiologiques indiquent que la consommation du régime de style occidental (western-style) est directement associée au développement du cancer colorectal (Hodge et al., 2015). Bien que le lien entre la consommation de régime hyper-gras (HG) et le développement de cancer colique soit connu, l'interprétation de l'effet de chacun des constituants alimentaires de régime HG sur l'élévation du cancer reste limitée (Fatima et al., 2019). En effet, une étude transversale chez les hommes coréens, confirme qu'un apport élevé en acide gras saturé est associé au risque de l'adénome colorectal (Kim et al., 2016). Des études menées sur les tumeurs spontanées chimio-induites ou transplantées chez le rongeur (Fay et al., 1997 ; Zhou et al., 2000), ainsi que les études internationales de corrélation (Bartsch et al., 1999) suggèrent que le régime hyperlipidique, en particulier les lipides saturés d'origine animale, peuvent augmenter le risque de la progression tumorale.

Néanmoins, Des travaux sur des modèles expérimentaux et de culture cellulaire ont démontré que non seulement la quantité de graisse, mais aussi le type de graisse qui est un facteur important dans la progression du cancer du côlon (Reddy, 1992, Beyaz et al., 2016). En effet, une étude a révélé les propriétés tumorigénèse de l'acide palmitique dans la promotion de la croissance du cancer colorectal (Fatima et al., 2019). D'autres études ont également suggéré que l'effet principal des graisses alimentaires dans la cancérogénèse colique s'effectue au cours de la phase post-initiation de la cancérogénèse (Reddy et al., 1984). De ce fait, les graisses, ou leurs acides gras, semblent jouer un rôle promoteur dans les cancers colorectaux.

La première hypothèse s'appuie sur le fait que les graisses sont la source alimentaire la plus concentrée en énergie. L'excès d'énergie serait promoteur de nombreux cancers en

favorisant la prolifération des cellules tumorales (**Bruce et al., 2001**). La consommation élevée de l'apport énergétique entraîne un développement de l'insulinorésistance avec une augmentation des taux circulants d'insuline, de triglycérides, et les acides gras non estérifiés. Ces facteurs circulants soumettent les cellules épithéliales du côlon à un stimulus prolifératif et les exposent également à des dérivés de réactifs de l'oxygène. Ces facteurs augmentent la prolifération et diminuent l'apoptose des cellules cancéreuses, ce qui a pour conséquence une promotion de la croissance tumorale (**McKeown-Eyssen & Giovannucci, 1994 ; Bruce et al., 2000**).

Une autre hypothèse suppose que les graisses agissent via les acides biliaires. De ce fait, l'ingestion de graisses déclenche la sécrétion des acides biliaires dans l'intestin, permettant l'émulsion et l'absorption des lipides. Ces acides biliaires primaires sont métabolisés en acides biliaires secondaires par une enzyme de la flore colique, la 7 alpha-déhydroxylase. Ces acides biliaires sont cytotoxiques, de même que les acides gras libres. Ils induisent une prolifération compensatrice des cellules épithéliales de la muqueuse colique, via le système de la protéine kinase C (**Park et al., 2012**). De même, les acides biliaires peuvent provoquer des dommages à l'ADN, et pourraient induire des mutations sur le gène K-ras impliqué dans la cancérogénèse colique qui entraîne la surexpression de Cox-2. Cette dernière est rarement exprimée dans la plupart des tissus normaux, mais est fortement exprimée dans les cellules cancéreuses. Cox-2 inhibe l'apoptose dans les cellules cancéreuses et favorise l'angiogenèse. En outre, la bile secondaire (Acide docosahexaénoïque) déclenche la production du récepteur de type urokinase et le facteur d'activation est associée à l'augmentation du caractère invasif des cellules cancéreuses du côlon (**Bruce et al., 2000**).

I.1.6.3. Les fibres alimentaires et le cancer du côlon

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont suggéré que les fibres alimentaires jouent un rôle primordial dans la prévention du cancer du côlon. En effet, certains travaux, ont confirmé une diminution de risque de cancer colorectal liée à la consommation des aliments riche en fibres (**Ben et al., 2014 ; Kunzmann et al., 2015**). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le lien entre les fibres alimentaires et la protection du cancer colorectal. Tout d'abord, une consommation accrue de fibres entraîne une dilution des cancérogènes fécaux en réduisant le temps de transit. D'autre part, la fermentation des fibres en acides gras à chaîne courte (AGCC) par la microflore intestinale qui pourrait avoir des propriétés anti-cancérigènes (**Morois & Boutron-Ruault., 2012**). Dans

une étude prospective réalisée par **Kunzmann et al. (2015)** ont rapporté une réduction du risque d'adénome colorectal est mise en évidence avec les apports très élevés en fibres, en particulier les céréales ou céréales et fruits. **Moen et al. (2016)** ont suggéré que le type de fibre alimentaire peut jouer un rôle dans la prévention du cancer colon, et que l'effet inhibiteur d'inuline sur la cancérogénèse colique est associé à des modulations dans le profil du microbiote caecal chez des souris.

I.1.7. Stress oxydant, inflammation et cancer du côlon

I.1.7.1. Stress oxydant et cancer du côlon

Il a été clairement établi que le stress oxydant est capable d'induire des changements au niveau du patrimoine génétique d'une cellule, et qu'il peut participer ainsi aux différents processus d'initiation de la cancérogénèse (**Pani et al., 2010**). Par définition, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les systèmes de défenses antioxydants. Ce déséquilibre peut être dû à un déficit nutritionnel en antioxydants, à une surproduction endogène d'origine inflammatoire ou à une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (**Migdal & Serres, 2011**). En effet, les radicaux libres sont des atomes ou molécules qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) qui leur confère une grande réactivité et la possibilité d'oxyder ou de réduire de nombreux composés afin de stabiliser leur orbitale externe. Cette caractéristique assure de l'énergie à ces radicaux qui peuvent aussi interagir avec d'autres molécules notamment ; les protéines, les lipides, l'acide nucléique (**Saud et al., 2014**).

Parmi les différentes classes de radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces réactives de l'azote (**Sies et al., 2017**). Les dérivés de l'oxygène qui constituent cette classe sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), et le peroxydinitrite. Les sources de production des radicaux libres sont multiples, parmi lesquels les systèmes endogènes et exogènes, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont principalement produites de manière endogène par le métabolisme mitochondrial. En effet, la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie réduit l'oxygène et génère ainsi des radicaux anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) (**Migdal et al., 2011**). Ce dernier, peut être réduit en peroxyde d'hydrogène par la voie des superoxydes dismutases (SOD), puis en H_2O , par la voie des catalases et des glutathion peroxydases (Gpx); ce sont des voies normales de détoxification et de protection cellulaires. Mais le peroxyde d'hydrogène peut, dans des situations pathologiques, par les mêmes voies, en présence de métaux dits de transition

comme le fer (Fe^{3+}) ou le cuivre (Cu^{3+}) qui activent la réaction, conduire à la formation permanente de composés radicalaires hydroxylés (**Migdal et al., 2011**).

Une perturbation de cette homéostasie peut engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les lipides par des perturbations des membranes cellulaires et l'ADN avec un risque de mutation et de cancérisation (**Angelos et al., 2006**). Ces altérations peuvent être à l'origine du processus de vieillissement et des maladies chroniques (cancer, diabète, maladies cardiovasculaires) (**Favier, 2003**).

• ***Les ERO induit la peroxydation lipidique dans le cancer colorectal***

L'oxydation des lipides membranaires et cellulaires, appelé peroxydation lipidique est un phénomène qui aboutit à la formation de différents dérivés lipidiques par oxydation des acides gras polyinsaturés présents dans les phospholipides, engendrant des modifications de la fluidité et de la perméabilité des membranes, et un dysfonctionnement de nombreux récepteurs, enzymes et transporteurs membranaires (**Sies et al., 2017**). Les ERO ont la capacité d'oxyder les acides gras polyinsaturés, elle fournit une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (**Marnett, 1999**). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4- HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (**Halliwell & Gttridge, 2007**).

De plus, ces produits de peroxydation lipidique en particulier le MDA et le 4- HNE peuvent exercer le rôle de transducteurs de signalisation et moduler à de faibles concentrations plusieurs fonctions cellulaires, notamment l'expression génique et la prolifération cellulaire (**Milane, 2004**). En effet, le MDA est un agent mutagène provoque des substitutions de paires de base mais aussi des délétions et des insertions de nucléotides modifiant les codons. Il est génotoxique entraîne des micronucleus (petits noyaux se formant lorsqu'un chromosome ou un fragment n'est pas incorporé dans une cellule fille au cours de la mitose) et des aberrations chromosomales (nombre ou structure des chromosomes anormal) (**Guéraud et al., 2010**). En outre, le MDA forme également des adduits sur les base de l'ADN de type MDA-guanine et d'autre dérivés (**Favier, 2003**).

D'autre part, les chercheurs ont observé que le HNE pourrait stimuler l'expression de la COX-2, qui induit directement une perte de gène Apc et réduit la dégradation de la β -caténine, pour provoquer une carcinogenèse colorectale (**Brown et al., 2005**).

• ***Les ERO et l'oxydation protéique***

Les protéines sont également sensibles aux attaques des ERO et sont fréquemment la cible d'une production accrue des radicaux libres. En effet, tous les acides aminés sont des cibles potentielles pour les ERO (**Levine, 1996**). Néanmoins, les cibles majeures sont les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), basiques (arginine, histidine, lysine) et aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) (**Favier, 2003**).

Les protéines peuvent subir à l'action directe des ERO suivant ces étapes : modifications oxydatives réversibles, conduisant à la formation de disulfures, l'acide sulfénique et de méthionine sulfoxyde résultant de l'oxydation des chaînes latérales des résidus cystéine et de méthionine, les plus sensibles à l'oxydation (**Stadtman, 1993**); l'oxydation de la chaîne polypeptidique potentiellement suivie d'une fragmentation et/ou de la formation de liaisons croisées intra ou inter chaînes; formation de protéines carbonylées issues de la fragmentation de chaînes polypeptidiques, de l'oxydation de certains acides aminés ou de l'interaction de leur chaîne latérale avec des produits de la peroxydation lipidique (**Levine, 1996**). Cette modification oxydative est impliquée dans de nombreux événements biologiques, telles que la transcription et la traduction (**Schieber & Chandel, 2014**). De plus, les protéines sensibles au rédox, dont la plupart sont impliquées dans l'initiation, l'évolution et le pronostic du cancer colorectal (**Yang et al., 2013**).

• ***Les ERO et altération d'ADN***

Les ERO est notamment, le radical hydroxyle (OH[•]) peut induire des altérations oxydatives de l'ADN, parmi elles, modification de paire de base du GC, avec substitutions, suppressions et insertions de bases azotés (**Saud et al., 2014**). Par ailleurs, certaines preuves suggèrent que les ERO sont impliquées dans la phase d'initiation, par la présence de des taux élevés de hydroxy-2'-deoxyguanosine (marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN) et de 4-hydroxy-2-nonéanal (marqueur de la peroxydation lipidique), ceci clairement dévoilent la relation entre le stress oxydatif et l'initiation de la cancérogénèse (**Liu et al., 2017**). Les ERO induisent également des altérations de la méthylation de l'ADN entraînant une instabilité chromosomique et une aneuploïdie.

I.1.1.7.2. Inflammation et le cancer du côlon

L'inflammation chronique est induite par des facteurs biologiques, chimiques et physiques et est à son tour associée à un risque de plusieurs cancers et notamment le cancer colorectal (**Bartsch & Nair, 2006**). Le lien entre l'inflammation et le cancer a été suggéré par

des études épidémiologiques et expérimentales (**Grivennikov, 2013 ; Okada, 2014**) et confirmés par des thérapies anti-inflammatoires qui montrent une efficacité dans la prévention du cancer (**Murillo et al., 2005**). En effet, différentes molécules et signaux inflammatoires jouent différents rôles au cours les phases de progression du cancer colorectal. Il est bien connu que les patients atteints d'une maladie inflammatoire intestinale sont plus susceptible de développer un cancer colique.

Les cellules inflammatoires peuvent également participer et augmenter les dommages de l'ADN par l'activation des pro-cancérogènes en des espèces endommageant l'ADN. Par exemple les neutrophiles et les macrophages peuvent libérer des quantités importantes de l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, et le radical hydroxyle par l'activation du système redox (**Truch et Kensler, 1991**). En effet, le stress oxydatif peut activer divers facteurs de transcription, notamment NF-kB, AP-1, p53, HIF-1 α , PPAR- γ , β -caténine / Wnt et Nrf2 (**Reuter et al., 2010**). Par exemple, le stress dû à la production du radical nitrile joue un rôle critique dans la carcinogenèse associée à une inflammation par l'activation d'AP-1, un facteur de transcription redox sensible (**Kroncke, 2003**). Aussi, la promotion de la voie inflammatoire se fait par surexpression de COX-2 (**Koehne & Dubois, 2004**). Cette surexpression active les cellules inflammatoires et les voies de signalisation impliquées dans la croissance et l'invasion tumorale et ce via la sécrétion de cytokines et des chimiokines qui vont recruter localement d'autres cellules inflammatoires, par chimiotactisme, et impliquer ainsi la réponse inflammatoire associée à la cancérogenèse (**Janakiram & Rao, 2014**). D'autres facteurs, tels que le microbiote intestinal et le régime alimentaire riche en lipide ou viande rouge, peuvent influencer le développement du cancer du côlon, en particulier par leur capacité à contrôler la transcription des cytokines pro-inflammatoire (**Terzic et al., 2010**).

I.1.8. Microbiote intestinal et cancer du côlon

I.1.8.1. Microbiote intestinal : Description et composition

Le tube digestif humain héberge plus de 10^{14} microorganismes (**Debré & Gall, 2014**). Il est composé de quatre phyla bactériens sont : les Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et les Proteobacteria (**Eckburg et al., 2005**). Des champignons et des Archaea peuvent être également résidents, mais représentent moins de 1% de la population totale, ce qui montre que l'écosystème digestif est nettement dominé par deux phyla bactériens les Firmicutes et les Bacteroidetes (**Tilg & Kaser, 2011**). Le nombre d'espèces bactériennes qui le composent varie selon les études mais il est généralement admis qu'il contient entre 500 et 1000 espèces

(Qin et al., 2010). Par ailleurs, le microbiote intestinal n'est pas homogène sa densité et sa composition évolue tout au long du tractus digestif (fig.9). De 10^1 à 10^3 bactéries par g de contenu dans l'estomac, il évolue de 10^4 à 10^7 bactéries par g de contenu dans l'intestin grêle, composé de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* appartenant à la flore de passage et des *Firmicutes*, *Bacilli* et *Actinobacteria*, pour atteindre 10^{11} à 10^{12} bactéries par g de contenu dans le colon, la flore est pratiquement identique à celle des selles avec la présence majoritaire des 3 phyla (*Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*) et en petite proportion de plus de 1000 espèces différentes (Walter & Ley, 2011). La colonisation massive de l'intestin débute lors de la naissance. Vers un an, le nombre de bactéries intestinales se stabilise et est comparable à celui de jeunes adultes. Cependant, la composition du microbiote évolue continuellement tout au long de la vie (Sekirov et al., 2010).

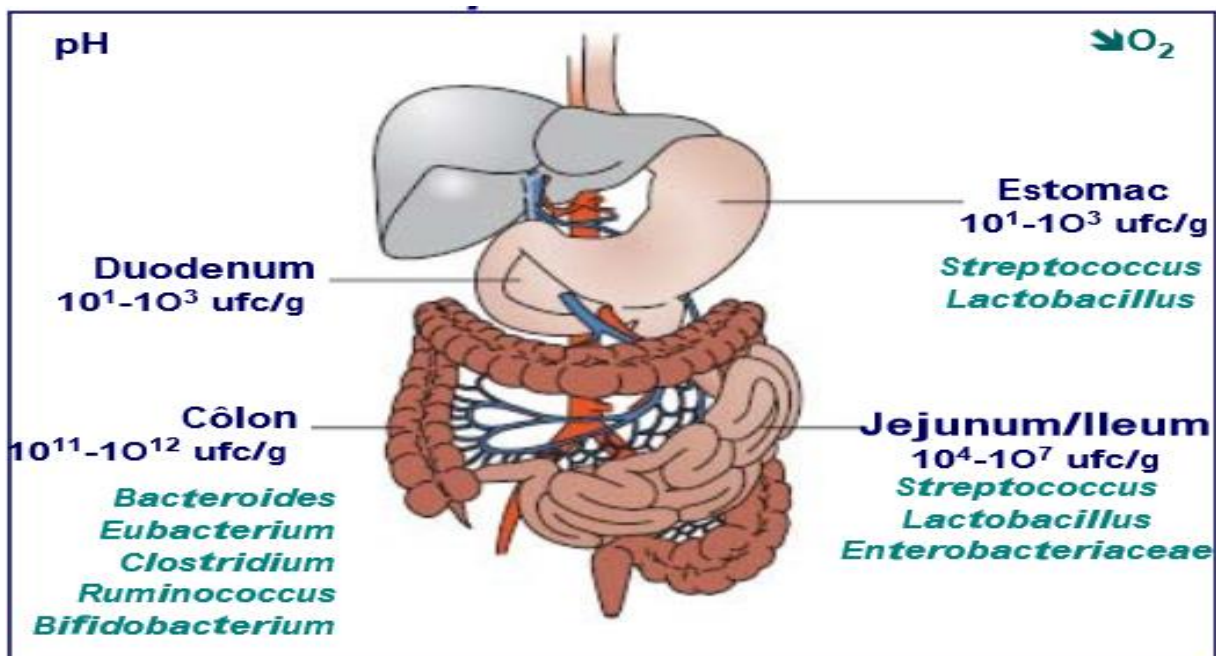


Figure 9 : Composition du microbiote intestinal d'après Ouwehand & vesterlund (2003).

I.1.8.2. Microbiote intestinal, maturation digestive et fonction intestinale

Le microbiote intestinal est un biotope majeur, indispensable à la maturation des fonctions digestives. Il exerce de nombreux effets, notamment sur l'angiogénèse, la trophicité intestinale (épaisseur de la muqueuse, tailles des villosités), la production de mucus, ou sur le système neuromusculaire entérique (Hooper, 2004). En effet, il participe au développement et à la maturation des systèmes de défense non spécifique de l'axe intestinal, et ainsi possède de nombreuses fonctions métaboliques et nutritionnelles. La diversité des substrats ; glucides non

digestibles, protéines endogènes et stérols sont dégradés et métabolisés par le microbiote, à partir de résidus d'hydrates de carbone, il produit des AGCC qui ont un rôle trophique majeur sur les colonocytes ou par l'intermédiaire d'hormones comme glucagon-like polypeptide 2 (Goulet et al ., 2009).

Le microbiote a un rôle primordial dans le métabolisme et la récupération des substrats énergétiques parvenant dans le colon suggérant ainsi son importance dans l'obésité. Il exerce également un rôle protecteur vis-à-vis de certaines toxines produites par les microorganismes pathogènes, soit en les dégradants, ou en modifiant la sensibilité des entérocytes à ces toxines. Il exerce donc des effets nutritionnels, métaboliques, trophiques et producteurs par les mécanismes cellulaires et moléculaires complexes (Debré et al., 2014). Leur perturbation peut entraîner des désordres importants, allant de simples troubles du transit intestinal à des pathologies inflammatoires voire cancéreuses (Nistal et al.,2015). La sécrétion des molécules « signal » par les bactéries pourrait moduler l'expression de gènes cibles au niveau de l'épithélium intestinal (Goulet et al ., 2012).

I.1.8.3. Dysbiose et cancérogénèse colique

Récemment, des études ont montré que le microbiote intestinal semble jouer un rôle dans l'étiologie du cancer colorectal, via des processus impliquant l'inflammation, les dommages à l'ADN, l'apoptose ou encore la production de toxines mutagéniques par la fermentation des ingrédients alimentaires. Ces métabolites pourraient se lier spécifiquement aux récepteurs de surface des cellules intestinales et par la suite affectent le signal de transduction intracellulaire (Louis et al., 2014 ; Vétizou et al ., 2016).

En réalité, la différenciation des cellules épithéliales est complètement dépendante d'interactions entre l'hôte et sa flore et un des rôles essentiels de la microflore est son effet trophique sur l'épithélium intestinal (Clausen et al ., 1992). En effet, des études chez l'homme ont montré que la composition du microbiote est altérée dans des carcinomes coliques des patients, cette modification est associée à une augmentation des *Bacteroides* sp. et des *Clostridium* sp. (Scanlan et al ., 2008 ; Collins et al., 2011). A l'inverse, le microbiote de personnes ayant un risque faible de cancer colorectal est abondant en bactéries produisant de l'acide lactique comme les *Lactobacillus* sp. (Moore & Moore, 1995). En parallèle, des travaux expérimentaux ont mis en évidence que des bactéries coliques résidentes pourraient se comporter comme des oncogènes : certaines souches d'*E. coli* par exemple ont la capacité de synthétiser une toxine ; la colibactine, à l'origine de dommages génotoxiques

(Nougayrede et al., 2011). De même, des macrophages infectés par *Enterococcus faecalis*, une bactérie de la flore intestinale, seraient capable de provoquer l'arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire et un phénotype d'instabilité chromosomique dans les cellules épithéliales intestinales (Wang et al., 2012). Ainsi que les bactéries sulfo-réductrices qui font partie de la flore intestinale habituelle produisent de sulfure d'hydrogène (H₂S). La production de sulfure est liée à la cancérogénèse, car il augmente la prolifération cellulaire, inhibe le métabolisme du butyrate par les colonocytes, et active certaines voies de transduction cellulaire défavorables (Ridlon et al., 2006).

En outre Wu et al. (2006) ont démontré que les toxine de *Bacteroides fragilis* ont un effet génotoxique agissant pendant la phase d'initiation du CCR via l'augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et la transduction des déclencheurs β caténine/Wnt signalisation dans les cellules épithéliales de l'intestin, ce qui contribue à la prolifération et la transformation oncogénique de CCR (Wu et al., 2003).

Des études ont identifié que *Fusobacterium nucleatum* comme un agent pathogène potentiel du cancer colique dans une analyse du microbiote intestinal des tissus cancéreux (Castellarin et al., 2012 ; Kostic et al., 2013). En effet, cette bactérie secrète une adhésine FadA (Fusobacterium adhesin A) au niveau de sa membrane qui en se liant à l'Écadhérine, stimule la croissance tumorale. Cela entraîne l'activation de la voie de signalisation WNT/ β caténine qui induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme les oncogènes c-myc et cycline D1, et dans l'inflammation comme les gènes codant les cytokines proinflammatoires IL6 et IL8 (Rubinstein et al., 2013). *F. nucleatum* est également capable d'inhiber l'activité antitumorale des cellules natural killer (NK) et des lymphocytes T qui infiltrent les tumeurs en se liant par sa protéine Fusobacterial apoptosis protein 2) Fap2 au récepteur T cell immunoglobulin and ITIM domain qui est exprimé à la surface de ces cellules immunitaires (Rubinstein et al., 2013). Enfin, d'autres travaux montrent une association entre certaines activités enzymatiques bactériennes ou encore certains métabolites bactériens et le risque de cancer colorectal, et cela a fait l'objet de nombreux travaux. Les activités bactériennes de β -glucuronidase, nitro et azo-réductase, β -glucosidase et 7 α -déshydroxylase, ainsi que les métabolites qu'elles génèrent sont le plus souvent associés à un risque accru de cancer (Li et al., 2014).

La dysbiose (altération du microbiote intestinal) est pensée pour déclencher l'inflammation chronique (Swidsinski et al., 2002 ; Bibiloni et al., 2006). Des altérations

dans le rapport de « nuisibles » et « bénéfiques » des bactéries commensales intestinales contribuent à l'augmentation de la perméabilité de la muqueuse, la translocation bactérienne, et l'augmentation de l'activation des composants du système immunitaire inné et adaptative de promouvoir l'inflammation chronique (Ivanov *et al.*, 2008 ; Sartor, 2008). En effet, l'activation du système immunitaire inné par les bactéries commensales conduit à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, IL-23, TNF- α et γ par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK. Au cours d'une inflammation persistante, le stress oxydant se développe plus particulièrement via la production des ERO et d'Espèce Réactives Nitrogénées (ERN) par les cellules de l'inflammation. Cette augmentation du stress oxydant peut conduire à une dysplasie suivie de carcinome. Les espèces réactives ERO et ERN générées par les cellules inflammatoires interagissent avec certains gènes clés impliqués dans les voies de signalisation de la carcinogenèse tels que p53 ou les gènes de réparation des mésappariements (Goodman *et al.*, 2004). L'ensemble de ces altérations favorise donc à la fois des mutations pro-carcinogènes, l'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN, la croissance des cellules tumorales, l'angiogenèse ainsi que la dispersion des cellules et permet d'établir le lien entre l'inflammation chronique et le développement du CCR (Grivennikov, 2013) (fig.10).

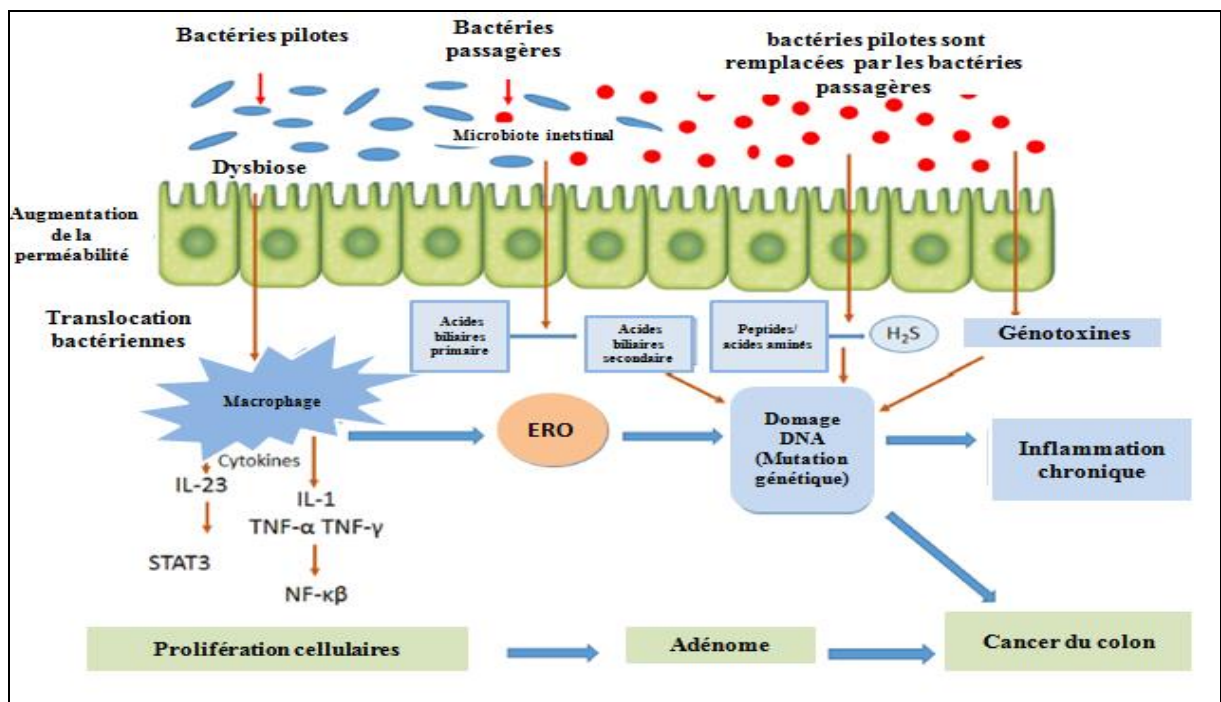


Figure 10: Mécanismes impliqués dans la promotion du cancer colorectal par le microbiote intestinal (Korada *et al.*, 2015).

I.1.9. Bactéries lactiques probiotiques et cancer du colon

I.1.9.1. Définition du statut « probiotique » d'un microorganisme

L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (**FAO/OMS en 2002**) définit les probiotiques comme des «micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice sur la santé de l'hôte ». La plupart des microorganismes considérés comme étant des probiotiques sont notamment des bactéries lactiques productrices d'acide lactique (*Lactobacilles* et *Bifidobacteries*). Un bon probiotique doit répondre aux critères et propriétés fonctionnelles suivants :

- Etre isolé à partir des mêmes espèces de l'hôte correspondant ;
- Ne doit pas être pathogénique ou toxique ;
- Survivre et présenter une résistance aux sucs gastriques et à la toxicité biliaire ;
- Adhérer et coloniser le tractus gastro-intestinal ;
- Rester stable et viable pendant le stockage et l'utilisation ;
- Produire des substances antimicrobiennes ;
- Moduler les réponses immunitaires de l'hôte (**Gupta et al., 2018**)

I.1.9.2. Principales bactéries lactiques probiotiques

Depuis très temps, les bactéries lactiques sont consommées dans des produits fermentés (produits dérivés du lait, de viande, la bière, le vin, le pain, les produits végétaux). Elles sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut Generally Regarded As Safe (GRAS), c'est-à-dire reconnues par les experts comme étant sans danger, sur la base des attestations scientifiques publiées (**Francois & Georges, 2005**). Ce groupe de bactéries rassemble un ensemble d'espèces hétérogènes dont le point commun est la production d'acide lactique comme principal métabolite suite à la fermentation des glucides. Elles peuvent être homo-fermentaires (70% de produit métabolique et de l'acide lactique) ou hétéro-fermentaires (50% acide lactique complété par d'autres composés tels que l'acide acétique, le CO₂ ou l'éthanol). Elles se trouvent dans de nombreux produits alimentaires et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale. Les bactéries lactiques se présentent le plus souvent sous la forme de coques ou de bacilles à Gram positif, non sporulés, non mobiles, catalase négatifs et dépourvus de cytochrome (**Emiliano et al., 2014**). Elles regroupent les genres suivant (**Dortu et al., 2009**):

Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactococcus, Streptococcus, Carnobacterium, Oenococcus, Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus et Vagococcus, Enterococcus, Bifidobacterium.

I.1.9.3. Etat des connaissances sur les mécanismes d'action des bactéries lactiques probiotiques sur le cancer du côlon

Les probiotiques ont des nombreuses propriétés qui leur confèrent la capacité d'avoir des effets anti-tumoraux. Ceci a été prouvé dans de nombreuses recherches. En effet, **Reddy et al. (1997)** ont démontré que les bactéries lactiques capables de produire divers acides gras libres, des acides organiques et d'autres métabolites, ce qui provoque une diminution du pH dans l'intestin. Cette baisse du pH est considérée comme l'une des principales propriétés des bactéries probiotiques réduisant l'incidence du cancer colorectal. Selon **Rafter. (2002)**, certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes procarcinogènes (bêta-glucuronidase, nitroréductase et azoréductase), Un effet similaire sur la β -glucuronidase a été obtenu avec une souche de *Bifidobacterium* dans un produit laitier fermenté (**Bouhnik et al., 1996**). En outre, les probiotiques réduisent les acides biliaries secondaires cancérrogènes (**Saito et al., 2017**), ceci est confirmé par des études in vitro et in vivo que certaines espèces de bactéries lactiques ont l'aptitude d'accumuler l'acide cholique (acide biliaire primaire) dans leur cytoplasme, ce qui évite sa biotransformation en acides biliaries secondaires (**Oberreuther-Moschner et al., 2004**). Ils ont également été démontré que les probiotiques diminuent les dommages d'ADN au niveau de la muqueuse intestinale et aident à maintenir une fonction de barrière intestinale (**Mennigen et al ., 2009**).

D'après **Lee et al. (2004)**, les probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* et *Bifidobacterium adolescentis* ont des propriétés antiprolifératives et inhibent la croissance et l'activité de trois lignées de cellules cancéreuses du côlon y compris les cellules Caco-2. Certains probiotiques peuvent augmenter les réactions immunitaires humorales et contribuent à l'activation de la phagocytose, ce qui peut inhiber le développement des cellules cancéreuses. Il a été prouvé également que les propriétés immunomodulatrices des probiotiques dépendent de la souche ; la survie et la persistance dans le tractus gastro-intestinal, ainsi que la posologie, peuvent également influencer sur le système immunitaire (**Vinderola et al ., 2006 ; Galdeano et al., 2007**). Ceci est conforté par **De Moreno et al. (2004)** qui observent sur des cellules isolées à partir de nodules intestinaux une augmentation des taux de TNF α et d'interféron gamma. L'ensemble de l'expérience est en faveur d'une inhibition par le yaourt de la promotion et de

la progression tumorale par modulation de la réponse immunitaire et stimulation de l'apoptose. En plus, des études ont dévoilé que les bactéries probiotiques produisent des enzymes antioxydantes qui aident à détruire certains composés qui causent les cancers (radicaux libres) ou qui en favorisent leur développement (Korada et al., 2015).

I.2. Généralités sur le grenadier (*Punica granatum* L.) et la grenade

I.2.1. Profil botanique du grenadier

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m d'hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il est originaire d'Iran et les pays voisins qui progressivement développé dans les régions d'Asie centrale jusqu'à Himalaya, Eyalet d'Anatolie, Moyen-Orient et la région méditerranéenne (Shaygannia et al., 2016). Ses feuilles sont brillantes, lancéolées, rigide et coriaces, ses fleurs sont généralement rouge-orangées ou écarlates, simples ou doubles, selon la variété et ses fruits contiennent des environ 600 graines pulpeuses séparées par un péricarpe membraneux blanc (Stover et al., 2007).

I.2.2. La grenade

La grenade est le fruit de grenadier, comestible et consommée depuis l'Antiquité, appartenant au genre *Punica* L., de la famille des *Punicaceae*. Elle est composée de trois parties à savoir, les graines constituent environ 30% du poids du fruit, les écorces représentent 26 à 30% du poids total des fruits et englobe les membranes internes (Lansky & Newman, 2007) (fig.11). L'écorce et les graines, considérés comme des coproduits, peuvent être valorisés pour donner des produits à valeur industrielle, médicinale et cosmétique (Dhumal et al., 2014).

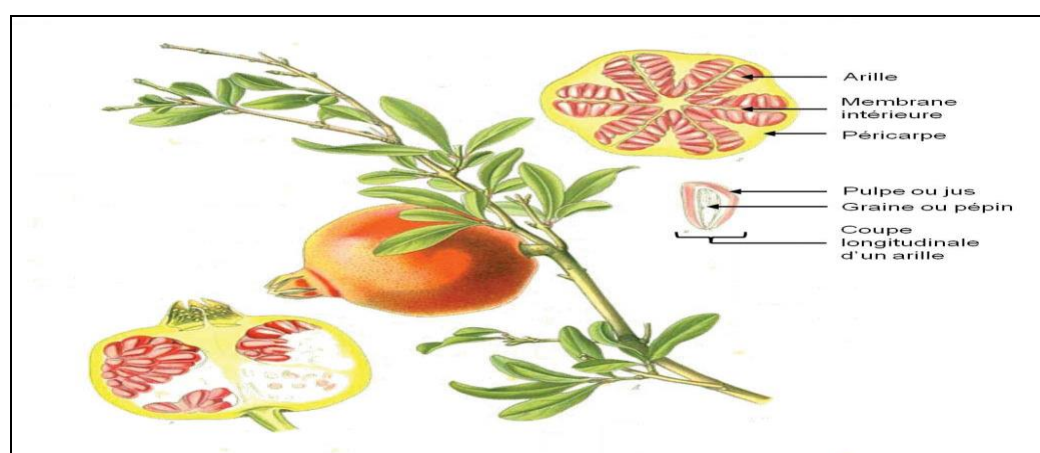


Figure 11 : Grenade, définition des différentes parties du fruit (Spilmont, 2013).

I.2.2.1. Composition de jus grenade et valeur alimentaire

Le jus évoque la partie la plus consommée de la grenade avec une valeur énergétique comprise entre 62 et 83 Kcal pour 100g, il est composé de 85.4% d'eau, 10.6% de sucres totaux, 1.4% de pectine, 1.7% de protéines (acides aminés majoritaires : proline, valine, methionine) , 0.3 à 1.2% de lipides et d'acides organiques (acide citrique, malique, tartarique, fumarique et succinique notamment). Le jus de grenade est concentré en vitamines C, B6 et B9 et comporte également les vitamines E, B1, B2 et B5 et les composés phénoliques (**Viuda-Martos et al., 2010**). Les composés phénoliques de jus de grenade comprennent les tanins hydrolysables [ellagitanins (Punicaline et punicalagine) et gallotanins (Digalloyl hexoside)], tanins condensés [proanthocyanidines: mélange d'unités flavan-3-ol (gallocatéchine-(4-8)-catéchine)], les flavonoïdes (catéchine) et les acides phénoliques (acide gallique et ellagique). La quantité totale en composés phénoliques du jus de grenade varie de (1385 à 2899 mg équivalent acide gallique/L), tanins (1200 à 2671 mg équivalent acide gallique /L), flavonoïdes (234 à 504 mg catéchine équivalent /L) et la teneur en anthocyanes (110 à 140 mg équivalent cyanidine 3-glucoside/L) (**Fischer et al., 2011**). La couleur rouge intense de jus de grenade est attribuée à la présence d'anthocyanes particulièrement (3-mono- et 3,5-diglucosides de cyanidine, delphinidine et pélargonidine (**Mphahlele et al., 2016**).

I.2.2.2. Vertus des jus de grenade

Les bienfaits du jus de grenade sont en grande partie attribués à sa grande richesse en polyphénols, en particulier à sa teneur en anthocyanes et en tannins hydrolysables (la punicalagine et la punicaline, les acides ellagique et gallique) (**Fahmy et al., 2020**). Ces molécules bioactives possèdent une capacité antioxydante importante ainsi que la propriété de réduire du taux de MDA et d'augmenter les enzymes antioxydantes tels que la SOD et la catalase (**Seeram et al., 2008**). La consommation de jus de grenade pourrait avoir comme effets, une modération de l'état inflammatoire (**Danesi & Ferguson, 2017**), une modulation de la flore intestinale (**Sorrenti et al., 2019**), réduction du taux de cholestérol et de triglycérides, inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) ,une meilleure sensibilité à l'insuline ainsi qu'une diminution de la glycémie (**Rouhi et al., 2017**) et une activité préventive contre les maladies cardiovasculaire (**Wang et al., 2018**) et ostéoporose (**Spilmont et al., 2013**). Aussi de nombreux travaux scientifiques ont rapporté que le jus de grenade ont des propriétés anti-tumorales (**Viladomiu et al., 2013**), et un effet antimicrobien (**Howell et al., 2013**).

I.2.3. L'écorce de grenade

L'écorce du fruit du grenadier, il s'agit de la partie dure du fruit. Elle représente environ 50% du poids total de la grenade (**Ismail et al ., 2012**). Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtre sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient incrustées (**Zahin et al., 2010**)(**fig.12**).

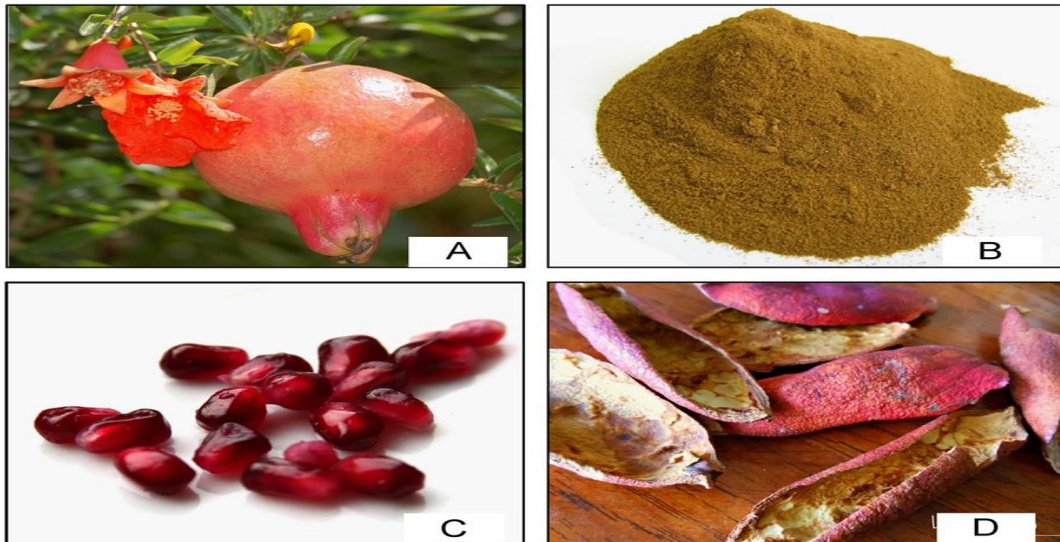


Figure 12. Fruit de grenade (*Punica granatum* L.) fruit(A) Poudre d'écorce de grenade (B) les grains (C) les écorces de grande séchées (D) (**Ismail et al., 2012**).

I.2.3.1. Composition chimique

L'écorce de grenade contient plusieurs composants potentiellement précieux, notamment, les fibres alimentaires, représentés par des pectines et de l'hémicellulose, les micronutriments et des quantités importantes, des composés phénoliques, notamment, les flavonoides (anthocyanes, catéchines et autres flavonoïdes complexes) et les tannins (punicaline, pédonculagine, punicalagine), acide gallique et ellagique (**Bassiri-Jahromi, 2018**)(**fig.13**). Elle contient aussi de nombreux minéraux dont le potassium, l'azote, calcium, magnésium, phosphore et sodium (**Viuda-Martos et al., 2010 ; Gullon et al. 2020**). Cette composition lui a attribué plusieurs propriétés biologiques (**tableau 2**)

Tableau 1 : Composition chimique moyenne de l'écorce de grenade (Rowayshed et al., 2013)modifié.

Composants	Poudre de l'écorce de grenade (%)
Proteines	3.1
Lipides	1.73
Fibres	11.2
Carbohydrates	80.5
Polyphenols totaux	27.92
Cendre	3.3
Humidité	13.7

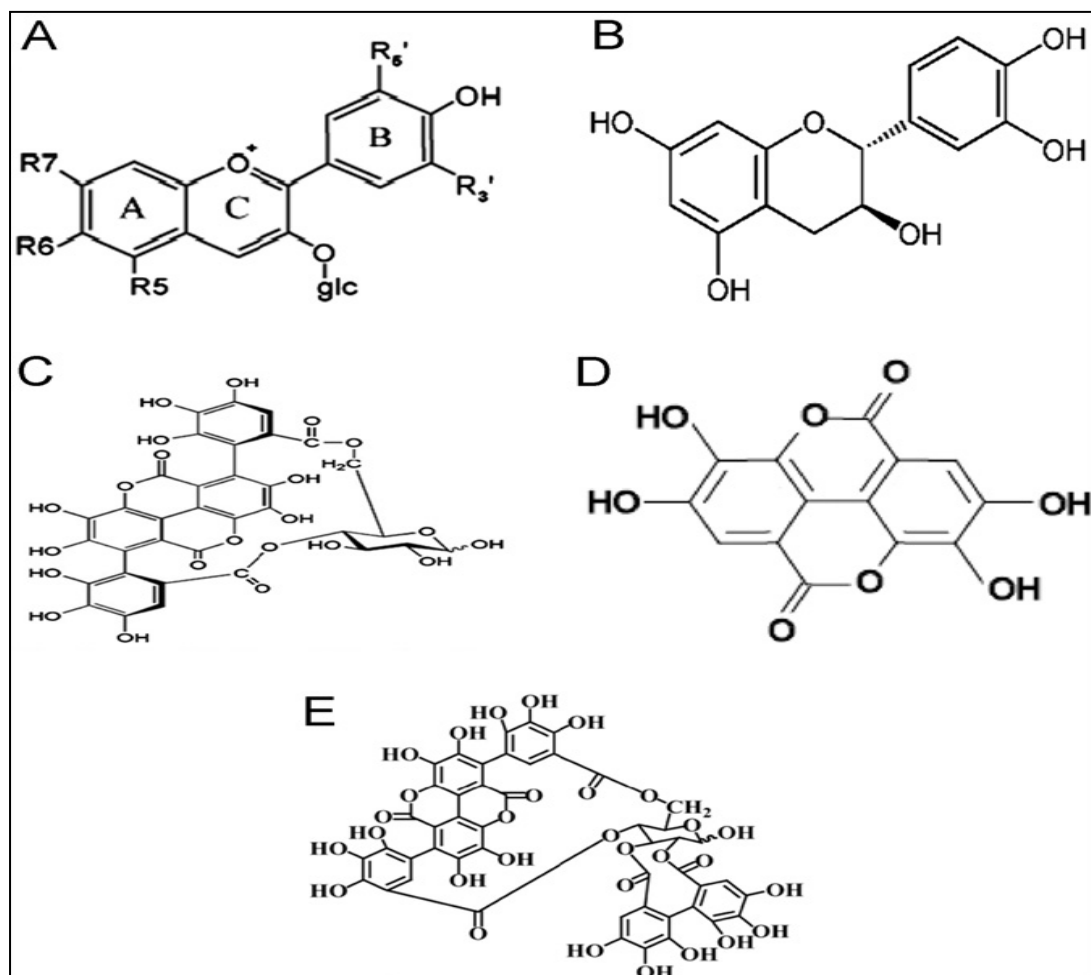


Figure 13. Structure chimique des principaux composés phénoliques de l'écorce de grenade
 (Bassiri-Jahromi, 2018)

(A) Anthocyanane (B) Catéchine (C) Punicaline (D) Acide ellagique (E) Punicalagine.

I.2.3.2. Les utilisations ancestrales de l'écorce de grenade comme remède

L'écorce de grenade est utilisée depuis des centaines d'années en médecine traditionnelle. Elle est considérée comme « une pharmacie en soi », l'écorce de grenade est utilisée pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. Elle est utilisée également pour traiter la dysenterie, les diarrhées, les ulcères et pour traiter les aphtes buccaux. Ils sont connus aussi pour leurs propriétés astringentes, vermifuges et anthelminthiques (**Bhowmik et al., 2013**).

I.2.3.3. Propriétés biologiques connues de l'écorce de grenade

De nombreuses propriétés biologiques de l'écorce de grenade ont été démontrées par plusieurs auteurs. On peut dénombrer les activités suivantes :

I.2.3.3.1. Propriétés antioxydantes

Les antioxydants sont des molécules qui contribuent à la protection de notre corps contre le stress oxydatif (**Williamson, 2017**). L'activité antioxydante de l'écorce du fruit est due sa richesse en polyphénols à savoir, les tannins hydrosolubles en particulier, l'acide ellagique, la punicalagine, la punicaline et l'acide gallique. Il a été démontré que l'écorce de grenade a un potentiel antioxydant puissant que les arilles et les graines (**Jalal et al., 2015**). En effet plusieurs études ont rapporté que les composés phénoliques de l'écorce grenade peuvent exercer une activité antioxydante dans le piégeage des radicaux libres (**Sun et al., 2017 ; Sorrenti et al., 2019**), ainsi dans l'inhibition de l'oxydation des LDL induite par le sulfate de cuivre (CuSO₄) (**Li et al., 2006**). En outre, des travaux ont prouvé que les composés phénoliques de l'écorce de grenade possèdent un pouvoir antioxydant via l'augmentation des enzymes antioxydants telles que la catalase, la SOD, la GPx et la glutathion réduit (GSH) (**Genena & Agamy, 2017**). Aussi, **Altunkaya. (2014)** rapportent que l'écorce de fruit peut inhiber la peroxydation lipidique, en réduisant les niveaux de lipides et de LDL peroxydés, en augmentant l'hydrolyse des lipides peroxydés.

I.2.3.3.2. Propriétés anti-inflammatoires

Il a été démontré que la grenade exerce des effets anti-inflammatoires par différents mécanismes notamment, l'inhibition des activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique en particulier, cyclooxygénase et la lipooxygénase (**Rahimi et al., 2011**), et dans la modulation d'expression des facteurs pro-inflammatoires tels NF- κ B et le TNF α . En effet, une étude réalisée sur un modèle de rat colite ont démontré

que l'extrait aqueux de l'écorce de grenade exerce un effet protecteur contre des lésions gastriques (Colombo et al., 2013). De même, une autre étude in vitro réalisée par Park et al. (2016) ont suggéré l'effet anti-inflammatoire de l'écorce de grenade en inhibant l'expression des cytokines inflammatoires à savoir TNF- α , IL-1 β , et MCP-1.

I.2.3.3.3. Propriétés anti-tumorales

Ces dernières années, de très nombreux travaux ont fait état d'une activité préventive contre les maladies cancéreuses. Des recherches plus récentes ont exhibé que la consommation de l'écorce de grenade pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate (Malik et al., 2005), de la peau, et du colon (Waly et al., 2012 ; Chen et al., 2018). Des travaux expérimentaux sur de nombreux modèles de tumeurs provoquées chez l'animal, ils ont montré un effet préventif de l'extrait d'écorce de grenade sur certaines tumeurs du sein, de la prostate, du colon et du poumon. En effet, une étude menée par Kasimsetty et al., (2010) ont confirmé ces données en rapportant que les polyphénols de grenade et leurs métabolites, à savoir, urolithins A et C, inhibent la prolifération des cellules cancéreuses, les HT-29, par l'arrêt de cycle cellulaire en G0 / G1 et G2 / M, en induisant ainsi la voie apoptotique. Aussi, Waly et al., (2012) ont suggéré que l'extrait de l'écorce de grenade inhibe le développement du cancer du côlon chimio-induit.

I.2.3.4. Toxicité de l'écorce de grenade

Compte tenu de l'utilisation des extraits d'écorce de grenade dans les compléments alimentaires, il est important de déterminer si des effets toxicologiques peuvent produire d'une consommation chronique et subchronique. Les extraits de l'écorce est une source très riche en substances phyto-chimiques qui peuvent provenir des effets toxiques a un taux de consommation très élevés ou à une administration à long terme (Vidal et al., 2003). Dans une étude de la toxicité aigüe chez le rat, une administration orale de la punicalagine à 180 mg/kg poids corporel/jour, suggère que cette dose est sans effet toxique observable (Patel et al., 2008). De même, Bassiri et al. (2015) ont démontré que l'administration orale répétée de différentes doses de l'extrait de grenade à des souris pendant 22 jrs, n'a produit aucun effet toxique en termes des paramètre biochimiques et histopathologiques. Par conséquent, l'absence des effets toxiques liés à sa consommation, font donc de la grenade un candidat intéressant pour l'exploration de nouvelles stratégies (nutritionnelles) pour prévenir le développement des maladies chroniques.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal : l'écorce de grenade

Il est constitué d'écorce du fruit de grenade (*Punica granatum* L.), un fruit occupant une place d'excellence dans l'arsenal des plantes médicinales pour sa richesse en composants bioactifs. Pour la réalisation de cette étude, ce fruit de la variété de Séfri a été récolté au niveau de la région de Mostaganem (Fernaka) le mois de Novembre 2015. Cette variété est caractérisée par un gros fruit jaune, graine demi-tendre rose clair, juteuse et sucrée (**fig.14**).



Figure14 : Fruit de *Punica granatum* L. (variété Séfri)

II.2. Matériel animal : les rats d'expérience

Les animaux utilisés au cours de cette expérimentation sont des rats Wistar mâles adultes et d'un poids initial de 231.9 ± 6.76 g, fournis par l'institut Pasteur d'Alger, des rats mâles ont été choisis à fin d'éviter les variabilités inter-sexe.

II.3. Souches bactériennes utilisées

II.3.1. Souches pathogènes

Les souches utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne sont des souches de collection internationale ATCC (American type culture collection), il s'agit d'*Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC 10536, *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) ATCC 6633, *Bacillus cereus* (*B.cereus*) ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ATCC 33862 et *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) ATCC 27853. Elles ont été fournies gracieusement par l'unité de microbiologie du groupe SAIDAL de Média et l'Hôpital Mostapha Bacha, Alger.

II.3.2. Souches bénéfiques

Les souches bénéfiques utilisées sont Lactibiane Tolérance® (PiLeJe, Référence 14BX4 06-2016, France) est un mixte de bactéries probiotique contenant 4×10^9 UFC/g de bactéries lactiques viables lyophilisées. Il est composé de cinq souches bactériennes : *Bifidobacterium lactis* LA 303, *Lactobacillus acidophilus* LA 201, *Lactobacillus plantarum* LA 301, *Lactobacillus salivarius* LA 302 et *Bifidobacterium lactis* LA304.

II.4. Analyse des composés phénoliques d'écorce de grenade

II.4.1. Modalités d'extraction des composés phénoliques d'écorce de grenade

II.4.1.1. Manipulation préparatrice à l'extraction

L'écorce de grenade a été soigneusement nettoyée et découpée en petits morceaux et séchée à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ces morceaux ont été ensuite broyés à l'aide d'un broyeur mécanique (Pulverisette, Fritsch, Allemagne) et tamisés dans un tamis ayant un diamètre de 500 μm .

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée par le biais de la technique de macération (**Hadrich et al., 2014**). Une masse de 10 g de matière végétale sèche sous forme de poudre a été macérée dans 125 mL de méthanol ou éthanol pur. Après une agitation de 24 h à température ambiante et à l'obscurité, une filtration a été faite sur papier filtre whatman n°1 (Whatman Ltd, Angleterre). Le filtrat obtenu a été débarrassé de son solvant à l'aide d'un Rotavapeur (Heidolph, W60, Allemagne) et ce afin d'obtenir un extrait sec. Ce dernier a été conservé à -20°C pour les éventuelles expérimentations.

II.4.1.2. Calcul du rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé par le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids initial de la poudre. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R\% = (PF/PI) \times 100}$$

Où :

R : Rendement en pourcentage (%).

PF : Poids de l'extrait sec en g.

PI : Poids de la poudre mise à l'extraction en g

II.4.2. Analyse phytochimique de l'extrait d'écorce de grenade

II.4.2.1. Méthode de dosage des composés phénoliques

Le dosage des composés phénoliques dans les différents extraits de l'écorce de grenade a été effectué par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton *et al.* (1999).

• Principe

Le réactif de Folin-ciocalteu de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdène ($H_3PMO_{12}O_{40}$).

Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques en milieu alcalin par ce réactif. Cette réaction entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu présentant un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 760 nm et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présent dans l'échantillon, le dosage des composés phénoliques a été effectué en comparant la densité optique observée à celle obtenue avec l'acide gallique (Biochem, Chemopharma, France) utilisé comme étalon et à des concentrations connues (**voir Annexe I**).

• Technique

250 μ L de chaque extrait ont été ajoutés à 250 μ L de réactif de Folin Ciocalteu (Sigma, Aldrich, USA) ayant une concentration de 0.2 N, après une incubation de 2 min, 500 μ L de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7.5 % (p/v) ont été additionnés. Le mélange ainsi obtenu a subi une incubation de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre (Shimadzu, Japan) à 760 nm contre un blanc qui contient les mêmes composants à l'exception de l'extrait testé qui a été remplacé par l'eau distillée. Les teneurs en composés phénoliques ont été exprimées en mg Equivalent Acide Gallique par g de matière sèche (mg EAG/g MS). Toutes les mesures ont été faites en triplicata

Le calcul de ces teneurs a été effectué selon la formule suivante :

$$C = (c \times V \times D) / m$$

Où

C : Teneurs en composés phénoliques exprimés en mg EAG/g MS.

c : Concentration de l'échantillon calculée.

D : Facteur de dilution.

V : Volume de solvant utilisé pour l'extraction (en mL)

m : Masse de l'échantillon utilisé pour l'extraction en g.

II.4.2.2. Méthode de dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes contenus dans les extraits d'écorce de grenade a été réalisée par la méthode de **Bahorun et al. (1996)**. Le principe de cette méthode est basé sur la formation de complexes de couleur jaune entre les composés phénoliques et trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Ceci traduit le fait que le métal perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. La couleur jaune présente une absorption maximale à 430 nm.

• Technique

1mL de la solution d'extrait a été ajouté à 1mL d' $AlCl_3$ à 2 % (p/v) (préparé dans le méthanol), Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance a été lue après 10 min d'incubation à une longueur d'onde de 430 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu, Japan). La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine et à des concentrations connues (Santa Cruz Biotechnology, Dallas). Les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en microgramme équivalent de Quercétine par gramme de matière sèche (μg EQ/g MS).Le dosage a été fait en triplicata

Le calcul de ces teneurs a été effectué selon la formule suivante :

$$C = (c \times V \times D) / m$$

Où

C : Teneur en flavonoïdes exprimée en mg Equivalent Quercétine par g de matière sèche.

c : Concentration de l'échantillon calculée.

D : Facteur de dilution.

V : Volume de solvant utilisé pour l'extraction (en mL)

m : Masse de l'échantillon en g utilisé pour l'extraction.

II.4.2.3. Analyse des composés phénoliques par HPLC

L'analyse des composés phénoliques des extraits d'écorce de grenade a été réalisée en utilisant un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) Agilent YL9100 (Agilent, Etats-Unis) équipé d'un détecteur UV (254 nm). Ces analyses ont été réalisées au niveau de Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) (Bou Ismail, Alger). La séparation a été effectuée par l'injection de 20 μ L filtré de chaque extrait d'écorce de grenade dans une colonne en phase inverse (Zorbax eclipse \times DB-C18), 15 cm de long et 4.6 mm de diamètre interne, en utilisant un débit de 1 mL / min, avec une phase mobile comportant l'eau acidifiée à 1% de l'acide acétique (A) et 100% de méthanol (B), à une température de 25°C. Le gradient d'élution est constitué de 95% de solvant A et 5% de solvant B suivi après 55 min par un gradient composé de 95% de solvant B et 5% de solvant A. Les chromatogrammes ont été détectés à 254 nm. Les composés phénoliques de chaque extrait d'écorce de grenade ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention (Rt) avec ceux des standards purs injectés dans les mêmes conditions.

II.5. Evaluation des activités antioxydante, antibactérienne in Vitro des extraits phénoliques de l'écorce de grenade.

II.5.1. Détermination du « Ferric reducing antioxydant power » (FRAP)

• Principe

Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) (Oyaizu, 1986).

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans l'extrait est déterminé selon la méthode décrite par Yang *et al.* (1986). 1 mL de l'extrait à différentes concentrations a été mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH=6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1% (p/v) (Merck, Allemagne). L'ensemble a été incubé au bain-marie (Mettler, Allemagne) à 50°C pendant 20 min ensuite, 2.5 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% (p/v) (Merck, Allemagne) ont été ajoutés pour stopper la réaction. Après incubation, un aliquote 2.5 mL a été combiné avec 2.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL d'une solution aqueuse de chlorure de fer III (FeCl_3) (Merck, Allemagne) à 0.1% (p/v). La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été réalisée à 700 nm contre un blanc. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé. Le potentiel réducteur des extraits et des standards est exprimé par

les valeurs de concentrations effectives à 50% (CE₅₀). Les valeurs sont définies comme étant des concentrations nécessaires pour donner une absorbance de 0.5 à 700 nm (Fernandes et al., 2017). Ce test a été réalisé en *triplicata*.

II.5.2. Détermination de l'activité antibactérienne

II.5.2.1. Réactivation des souches et préparation des pré-cultures

A partir des milieux de conservation, un prélèvement de chaque souche a été effectué à l'aide d'une anse en platine, puis mis dans 10 mL de bouillon nutritif et incubé à 37°C pendant 24 h. Après ce temps d'incubation, chaque souche a subi un repiquage en milieu solide sélectif, ces ensemencements ont été suivis d'une incubation de 18 h à 37°C et ce afin d'obtenir des cultures jeunes.

II.5.2.2. Méthode de diffusion sur gélose

A partir d'une culture jeune de 18 h d'incubation, une suspension bactérienne a été préparée dans l'eau physiologique stérile (0.9%). La turbidité de cette suspension a été ajustée à 0.5 Mac Farland. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0.08 et 0.13 ce qui correspond à une concentration de 10⁷ à 10⁸ UFC/mL. L'inoculum ainsi ajusté a été ensemencé à l'aide d'un écouvillon par la technique des stries sur toute la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (Parodonsia, Conda S A, Espagne). Après cette étape les boîtes de Pétri ont été séchées à l'air libre pendant 30 min, ensuite des disques de Whatman de 6 mm de diamètre imprégnés 20 µL de chaque extrait, ont été déposés à la surface de la gélose ensemencée. La lecture des boîtes a été faite après 24h d'incubation à une température de 37°C (Adesokan et al., 2007). Pour réaliser ce screening antibactérien des concentrations de 250 à 62.5 mg/mL ont été utilisées.

Des boîtes dites témoins positifs dans lesquelles sont mis des disques d'antibiotique Tétracycline (20µg/mL), Chloramphenicol (30µg/mL), et d'autres dites témoins négatifs contenant des disques imbibés de Diméthylsulfoxyde (DMSO) pur (Sigma-Aldrich,USA) » ont été réalisées. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque. Ce test a été effectué en *triplicata*.

II.5.2.3.Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)

Cette technique consiste à ensemencer une gamme de concentration décroissante en extrait par un inoculum standardisé. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne visible (Chebaibi et al., 2016).

• Technique

250 mg /mL de chaque extrait (méthanolique ou éthanolique) ont été préparés et dilués dans un bouillon Mueller Hinton à des concentrations décroissantes (125 ; 62.5 ; 31.25 ; 15.62 ; 7.81; 3.90; 1.95 ; 0.97 ; 0.48; 0.24 mg /mL). Ensuite 95µL de chaque concentration, ont été déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits (Klančnik et al., 2010). Les puits ainsi préparés ont été inoculés par 5 µL de l'inoculum de chaque suspension bactérienne à étudier (*S. aureus*, *E.coli*, *B.subtilis*, *B. cereus* et *P. aeruginosa*). Le bouillon Muller Hinton seul a été ajouté dans des puits de la même microplaque, et ce afin de servir de témoin négatif, alors que des autres puits ont reçu le milieu Mueller Hinton inoculé par la même concentration des bactéries citées précédemment et sans extrait (témoin positif).

Les microplaques ainsi préparées ont été incubées 18 h à 37°C. A la fin de cette incubation la croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant 20 µL d'un révélateur de croissance le 2,3,5-tripheny-tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich, USA). La CMI a été déduite à partir du premier puits de concentration dépourvue de croissance bactérienne. Pour la détermination des CMB, des prélèvements ont été pris à partir des puits qui ne montrent aucune croissance bactérienne et ensemencés sur la gélose de Muller Hinton puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h.

II.6. Exploration de l'effet in Vivo de la poudre d'écorce de grenade seule ou associée à des souches bénéfiques sur des lésions précancéreuses du colon chimio-induites.

II.6.1. Régime alimentaire administré aux rats

À fin d'évaluer l'effet préventif de l'écorce de grenade seule ou associée aux probiotiques sur des lésions cancéreuses chimio-induites, les rats ont reçu durant cette expérimentation soit le régime standard, soit le régime hyper-gras élaboré et enrichi en 48% (p/p) graisse animale d'origine ovine (tableau 2). Au cours de cette période, la préparation des différents régimes a été réalisée une fois par semaine au sein du laboratoire d'Ecologie Animale de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret. Les ingrédients utilisés pour préparer chaque régime ont été fournis gracieusement par l'Office National d'Aliment de Bétail (ONAB). La composition des régimes figure dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Composition des régimes utilisés durant l'expérimentation selon Blandine (2006) modifiée.

Ingrédients	Régime standard (g /100g de régime)	Régime hyper-gras (g /100g de régime)
Amidon de maïs	42.1	2.6
Cellulose	11.8	9.4
Protéines	19	20
Matière grasse	0	48
Glucides	3.3	3.5
Vitamines et sels minéraux	10.8	10.33
Huile végétale	8.05	6.17
Valeur énergétique (Kcal/100g)	330.33	591.93

II.6.2. Concentrations des souches bénéfiques utilisées

Le mélange de probiotique a été administré aux rats sous une forme lyophilisée, incorporé dans l'aliment à une dose de 4×10^9 UFC/kg d'aliment.

II.6.3. Concentrations de la poudre d'écorce de grenade utilisées

La poudre d'écorce de grenade a été incorporée au régime alimentaire hyper-gras à raison d'une concentration de 2.5 g par 100 g d'aliment. Cette concentration a été choisie en se basant sur une étude préliminaire. Le choix de l'utilisation de la poudre issue de l'écorce de

grenade dans cette étude est dû essentiellement à sa richesse à la fois en polyphénols et en fibres alimentaires qui lui confèrent un effet synergique bénéfique sur la santé largement décrit par **Rouhi et al. (2015)**.

II.6.4. Méthode d'induction chimique des lésions précancéreuses du côlon

L'induction du cancer du côlon a été réalisée chez le rat par une injection sous cutanée de DMH (Sigma-Aldrich, USA) dissous dans une solution saline (0.9%). Cette injection a été effectuée à raison de 30mg/kg de poids corporel une fois par semaine et pendant neuf semaines de traitement. La dose de DMH a été sélectionnée en se basant sur les données décrites par **Park et al. (2007)**, ainsi que sur une étude préliminaire confirmative.

II.6.5. Conditions d'élevage des rats

Pour réaliser cette partie expérimentale, 36 rats *Wistar* mâles présentant un poids initial de 231.9 ± 6.76 g, dès leur réception ces rats ont été placés dans des cages individuelles et hébergés dans des conditions favorables au sein de l'animalerie du laboratoire d'autopsie clinique de l'Institut des Sciences Vétérinaires (Université Ibn Khaldoun. Tiaret), où règne une température constante ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) et un éclairage qui varie selon un rythme circadien 12 h jour, 12 h nuit. Le protocole expérimental de suivi et l'entretien des rats a été réalisé selon les directives du comité institutionnel de protection des animaux de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique (Algérie) (Numéro d'accord 45/DGLPAG /DVA.SDA.14). Les rats ont eu accès à volonté à l'eau de boisson et à un régime standard pendant deux semaines correspondantes à une période d'acclimatation.

II.6.6. Définition des lots et adaptation des rats à l'expérience

Après la période d'acclimatation ces animaux ont été séparés en 06 groupes (**fig.15**). Ces groupes ont été conçus comme suit :

- Le premier groupe a reçu uniquement le régime standard (tableau 1) celui-ci a servi de témoin négatif non traité par le DMH.
- Les animaux du deuxième groupe ont reçu un régime hyper-gras contenant 48% de graisse animale d'origine ovine (tableau 1) et une injection par voie sous cutanée d'une solution saline (NaCl 0.9%) (témoin négatif non traité par DMH)
- Le troisième groupe a reçu un régime standard et une injection par voie sous cutanée de DMH à 30mg/kg du poids corporel, une fois par semaine sur une période de neuf semaines de traitement (témoin positif traité par DMH)

- Les rats du quatrième groupe ont subi un régime hyper-gras et traités par une injection par voie sous cutanée de DMH à 30 mg/kg du poids corporel une fois par semaine pendant neuf semaines de traitement (témoin positif traité par DMH).
- Les rats du cinquième groupe ont été traités par le régime hyper-gras incorporé de 2.5% (p/p) d'écorce de grenade ainsi une injection par voie sous cutanée de DMH à 30mg/kg une fois par semaine pendant neuf semaines de traitement.
- Les animaux du sixième groupe, ont reçu le régime décrit précédemment additionné de probiotiques à une dose de 4×10^9 UFC/kg d'aliment « Lactibiane tolérance® » et une injection par voie sous cutanée de DMH à 30mg/kg une fois par semaine pendant neuf semaines de traitement.

Durant l'expérimentation (16 semaines), les poids des rats ainsi que la quantité de nourriture ingérée ont été pesés deux fois par semaine.

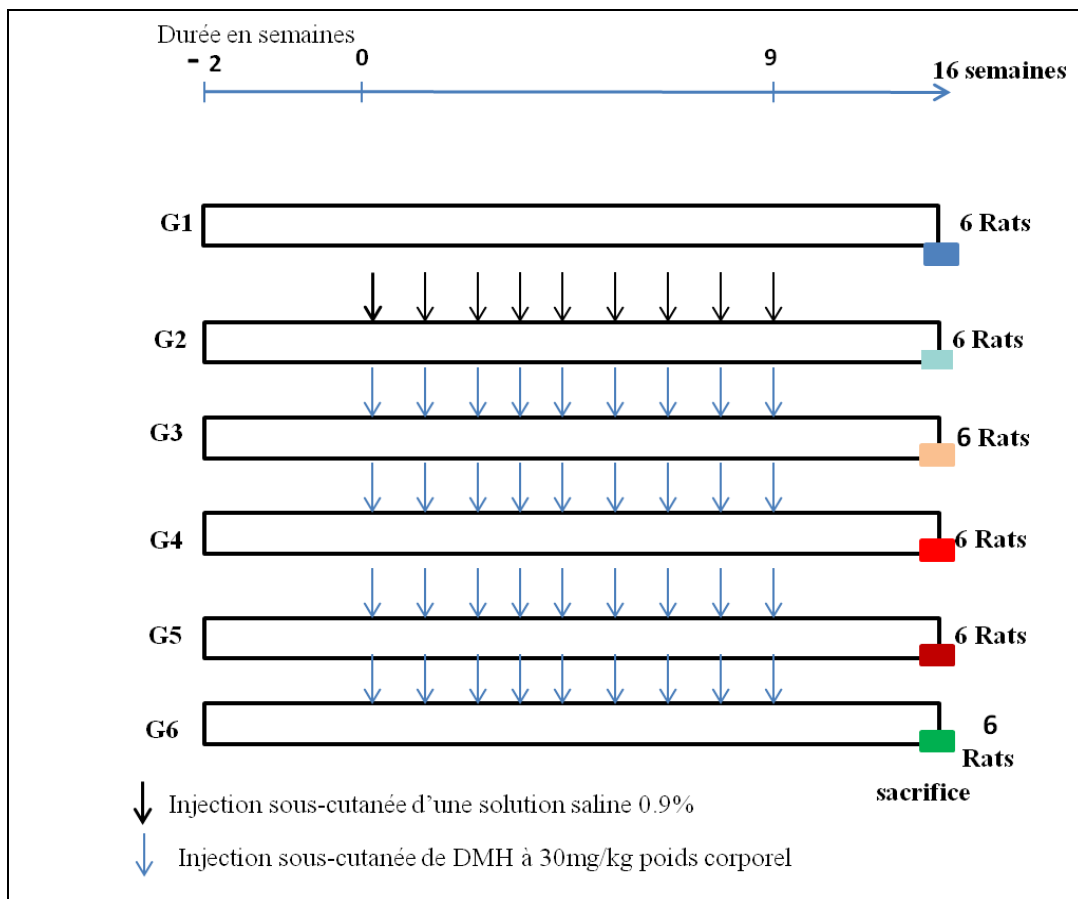


Figure 15: Protocole du suivi et traitement des rats au cours de l'étude

II.6.7. Les prélèvements de sang et d'organes

• Prélèvement de sang

Les animaux, à jeun depuis une nuit, sont anesthésiés et sacrifiés. Le sang a été prélevé par ponction intracardiaque et récupéré dans des tubes héparinés. Après une légère agitation, les tubes ont été centrifugés à 3000 trs pendant 10 min. Le plasma a été ensuite récupéré, aliquoté et conservé à -20°C pour les analyses biologiques ultérieures, concernant les paramètres biochimiques et oxydatifs.

• Prélèvement des organes

Après le prélèvement sanguin, les différents organes (le colon, le cœur, les poumons, le foie, la rate, l'intestin grêle, les reins, le cerveau, le muscle et les tissus adipeux) sont soigneusement prélevés, rincés avec l'eau physiologique (NaCl) à 0.9% séchés puis pesés et conservés à -20°C pour d'éventuelles explorations.

• Préparation de l'homogénat d'organes

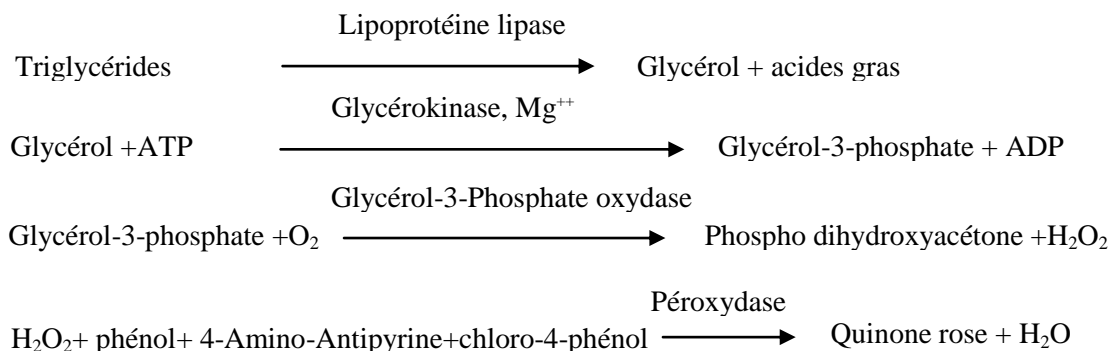
0.5g d'organe (foie ou côlon) a été additionné dans 5mL de tampon phosphate à pH 7.4. Le mélange a été broyé à l'Ultra-Turrax (T25, IKA, Allemagne), puis centrifugé à 3000 trs pendant 10 min. Le surnageant a été récupéré directement dans un tube sec pour les dosages oxydatifs.

II.6.8. Les diverses méthodes de dosage utilisées

II.6.8.1. Dosage des Triglycérides (TG)

• Principe

Le dosage des triglycérides sériques se fait par le biais d'une méthode colorimétrique enzymatique (kit Biomaghreb, Ariana Tunisie). Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acides gras grâce à des lipases. L'indicateur est la quinoneimine formé à partir du peroxyde d'hydrogene ,4-amino-antipyrine et 4-cholorophénol sous l'action de la peroxydase. La concentration en triglycérides est déterminée à une longueur d'onde de 505 nm (Fossati et al ., 1982).



• Mode opératoire

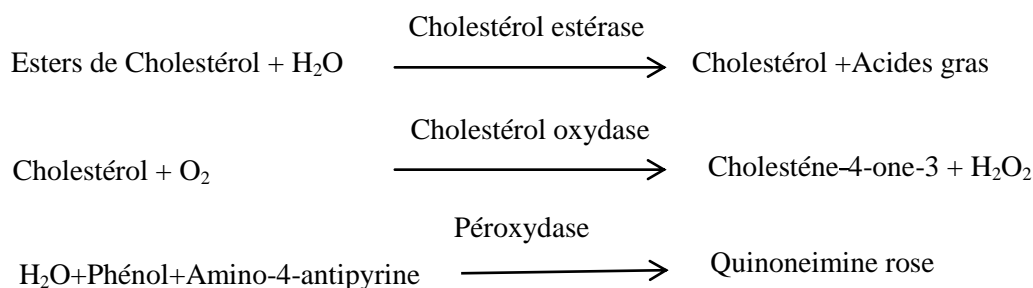
10 μL de chaque échantillon ou de l'étalon (concentration de 2g/L) ont été prélevés et ensuite ajoutés à 1mL de la solution de travail, préparée en mélangeant les réactifs 1 et 2 fournis par le kit, ensuite une homogénéisation a été appliquée à l'ensemble à l'aide d'un vortex, le mélange a subi une incubation de 10 min et à 37°C. L'absorbance a été ensuite mesurée au spectrophotomètre (Shimadzu, Japan) à 505 nm contre un blanc les résultats sont exprimés en g/L de triglycérides et calculés selon la formule suivante :

$$\text{Triglycérides (g/L)} = (\text{Densité optique de l'échantillon/Densité optique de l'étalon}) \times 2\text{g/L}$$

II.6. 8.2. Dosage du cholestérol total (CT)

• Principe

Le cholestérol total a été dosé par une méthode enzymatique colorimétrique en utilisant le kit Biomaghreb et ce au niveau du plasma. Les esters de cholestérol sont hydrolysés par la cholestérol estérase en cholestérol libre et en acides gras. Ce cholestérol libre produit et celui préexistant est oxydé par une enzyme cholestérol-oxydase en Δ^4 cholesténone et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier en présence de peroxydase, oxyde le chromogène en un composé coloré. La densité optique du quinonéimine coloré mesurée à 505 nm est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol contenu dans l'échantillon, et est exprimée en g/L (Fasce, 1982).



- **Mode opératoire**

10 µL de chaque échantillon et l'étalon ont été prélevés et ensuite ajoutés à 1mL de la solution de travail (mélange de réactif 1 et 2 fournis par le kit Biomeghreb, l'ensemble a subi une homogénéisation à l'aide d'un vortex, le mélange ainsi obtenu a été incubé pendant 10 min à 37°C. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 505 nm. Notons que l'étalon a été utilisé afin de quantifier le taux du cholestérol dans les échantillons cet étalon contient une quantité précise de cholestérol qui est de 2g/L, ce dernier a subi les mêmes conditions expérimentales que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en g/L de cholestérol et calculés selon la formule suivante.

$$\text{Cholestérol (g/L)} = (\text{Densité optique de l'échantillon} / \text{Densité optique de l'étalon}) \times 2 \text{ g/L.}$$

II.6.8.3. Dosage du cholestérol HDL (C-HDL).

- **Principe**

La lipoprotéine de haute densité (HDL) du plasma est précipitée par le phosphotungstate en présence d'ions de magnésium. Après centrifugation à 4000xg pendant 20 min, le surnageant récupéré correspond au HDL. La lecture se fait à 505 nm.

- **Mode opératoire**

1mL de l'échantillon a été ajouté à 100 µL de réactif issu de mélange de deux réactifs (R1 et R2). Le mélange a été incubé pendant 10 min à température ambiante puis centrifugé 15 min à 4000 trs et ensuite le surnageant a été dosé par la même procédure de cholestérol total.

II.6.8.4. Calcul du cholestérol LDL (C-LDL)

Les concentrations en cholestérol LDL plasmatiques sont déterminées selon la formule de **Friedewald et al. (1972)** à condition que la concentration des triglycérides soit inférieure à 3,5 g/L.

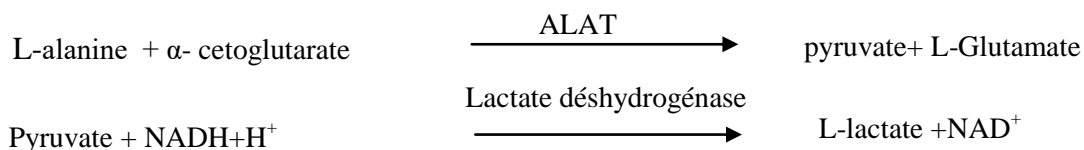
$$\text{C- LDL} = \text{Chol.Total} - (\text{C-HDL} + \text{TG}/5).$$

II.6.8. 5. Détermination de l'activité des transaminases plasmatiques

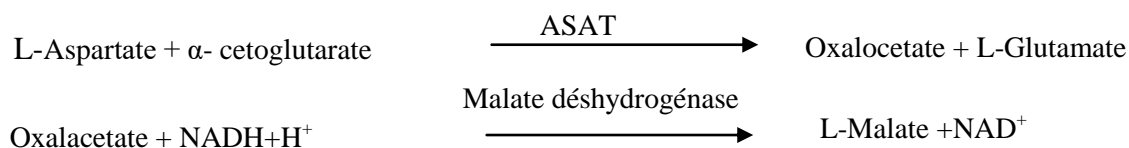
- **Principe**

L'alanine aminotransférase (ALAT) est une transaminase connue sous le nom de glutamate-pyruvate-transaminase. L'ALAT catalyse le transfert du groupe aminé de la L-alanine vers l'α-cétoglutarate pour donner du L-glutamate. La détermination de l'activité de

l'ALAT s'effectue par une méthode cinétique. La lecture a été faite à 340 nm (**Bergmeyer et al., 1978**).



L'aspartate aminotransférase (ASAT) est une transaminase également connue sous le nom de glutamate-oxalo-acétate-transaminase. Elle catalyse le transfert du groupe aminé du L-aspartate vers l' α -cétoglutarate pour donner du L-glutamate. La lecture a été faite à 340 nm (**Bergmeyer et al., 1978**).



• Mode opératoire

50 μL de l'échantillon soit d'origine plasmatique a été ajouté à 500 μL de solution de travail issu d'un mélange de deux réactifs (R1 et R2) préparé selon le kit Biomaghreb. Puis le mélange a été incubé dans une étuve à 37°C. La lecture de l'absorbance s'effectue pendant 3 min à 340 nm.

II.6.8.6. Détermination du pouvoir antioxydant total par la technique FRAP «Ferric Reducing Antioxydant Power »

• Principe

La méthode FRAP développée par **Benzie & Strain. (1996)** est basée sur la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique $[(\text{Fe}(\text{III})\text{-TPTZ})_2]$ en un complexe tripyridyltriazine ferreux $[(\text{Fe}(\text{II})\text{-TPTZ})_2]$ par un antioxydant, à un pH 3.6 pour maintenir la solubilité du fer (**fig.16**). Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm. Le pouvoir réducteur est proportionnel à la formation de la couleur bleue, plus la couleur bleue est intense, plus l'échantillon peut être considéré comme un bon réducteur.

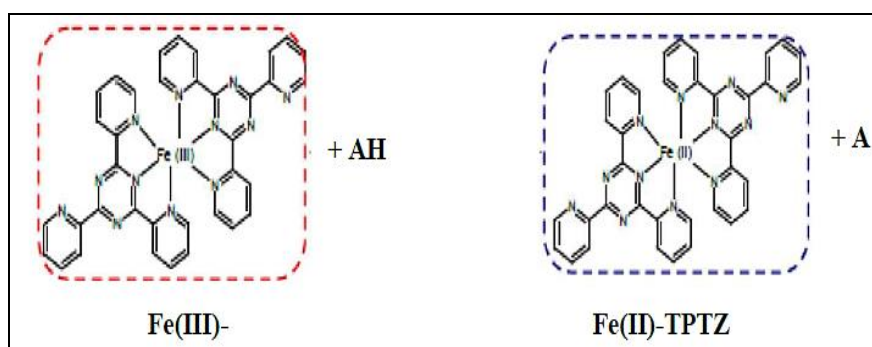


Figure 16 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH) (**Benzie & Strain,1996**).

• Mode opératoire

Ce test peut être utilisé comme un index du pouvoir antioxydant des défenses non enzymatiques. Il est basé sur la mesure de la réduction par le plasma ou l'homogénat d'organe et dans des conditions d'acidité (pH 3.6), d'une solution comprenant du tampon acétate, 2,4,6 Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich, USA), et un sel ferrique ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$), ce qui provoque la formation du complexe TPTZ- Fe^{++} , de couleur bleue. Une gamme étalon est obtenue à partir d'une solution mère de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à $1000\mu\text{M}$ (les courbes de la gamme d'étalonnage figurent en **Annexe III**). La solution FRAP a été préparée à partir des trois solutions initiales : tampon acétate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2, 3\text{H}_2\text{O}$ et $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) à pH 3.6, TPTZ à 8 mM et FeCl_3 à 20 mM) et placée à 37°C pendant toute la durée de l'analyse. Pour effectuer cette analyse 50 μL d'échantillons ou de la solution-gamme, et 50 μL de l'eau distillée sont ajoutés à 900 mL de la solution FRAP. La lecture des échantillons se fait après 30 min d'incubation par spectrométrie à 593 nm.

II.6.8.7. Dosage des groupements Thiols

• Principe

L'oxydation des protéines a été déterminée selon **Faure et Lafond, (1995)** par la mesure des groupements thiols (SH) dans le plasma. Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfures S-S. Le principe de dosage des groupements SH est basé sur leur réaction avec le 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) pour former un composé coloré qui absorbe à une longueur d'onde à 412 nm.

• Mode opératoire

La gamme étalon a été obtenue avec une solution de N-Acetyl-Cystéine (NAC) (1mM) (Sigma-Aldrich, Allemagne). 250 μ L d'échantillon ou de point de gamme ont été ajoutés à 750 μ L de tampon phosphate (pH=8), après une légère agitation 250 μ L de réactif d'Ellman contenant DTNB (Sigma-Aldrich, Allemagne) ont été ajoutés, le mélange ainsi obtenu a été vortexé et incubé pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. La lecture des absorbances a été effectuée à 412 nm.

II.6.8.8. Détermination des TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

• Principe

L'évaluation des teneurs en MDA est basée sur une méthode de dosage indirecte de l'impact des radicaux libres. Elle mesure les substances issues de la lipo-péroxydation réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA). La réaction de dosage, décrite par **Kohn et Liversedge.(1944)**, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol (**fig.17**). La réaction colorée, observée avec TBA, mesure non seulement le malondialdéhyde préexistant, mais aussi le malondialdéhyde formé de manière artefactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et de ceux générés au cours même de la réaction. Les méthodes utilisées actuellement dérivent de celle de **Yagi (1976)**.

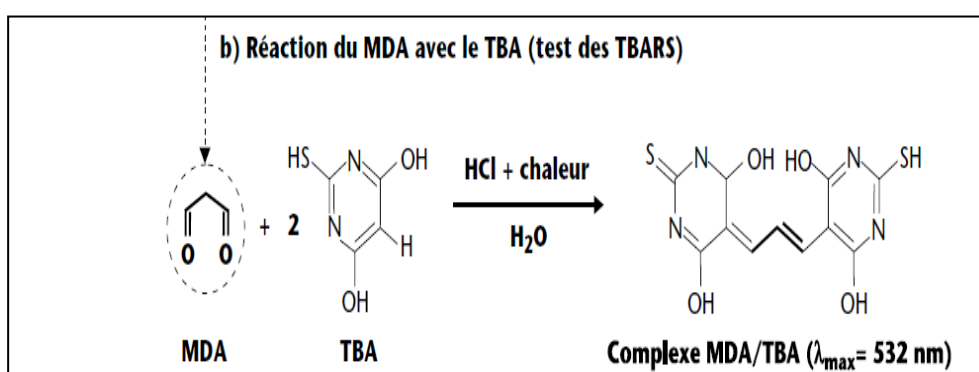


Figure 17: Formation d'un chromophore entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (**Dahle et al., 1962**).

• **Mode opératoire :**

Cette analyse a été réalisée sur plasma, 200 µL d'échantillon ont été ajoutés à 800 µL de mélange d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.37% (p/v) (Sigma-Aldrich, USA), d'acide trichloracétique (TCA) à 20% (p/v) (Sigma-Aldrich, USA), 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol (BHT) à 0.01% (p/v) (Sigma-Aldrich, USA) et chlorure d'hydrogène (HCl) à 1N. Après agitation de 2 min, le mélange est incubé au bain marie à 100°C pendant 15 min. Pour arrêter la réaction, les tubes sont placés dans la glace pendant 10 min complexe ainsi formé est extrait par le butanol-1 pendant 2 min. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min et 4°C (Sigma, 3K10, Laborzentrifugen, Allemagne). Le surnageant a été récupéré et la lecture des absorbances a été effectuée à 532 nm. La concentration en MDA plasmatique est calculée en utilisant une courbe étalon de 1, 1, 3,3-Tétra EthoxyPropane (Sigma-Aldrich, USA).

II.6.9. Technique d'histologie du colon

Après le prélèvement du colon, ce dernier a été rincé avec une solution de NaCl à 0.9%. Ce dernier a été ouvert longitudinalement et placé sur des bandes de papier filtre. La préparation des coupes histologiques a été effectuée selon les étapes suivantes conformément à **Bancroft & Gamble (2008)**.

A- Fixation

Cette étape a pour but d'immobiliser les structures en respectant leur morphologie et en le gardant dans un état aussi proche que possible de l'état in Vivo tout en renforçant la consistance du tissu. Dans notre cas, la fixation s'est effectuée dans 10% du formol.

B- Déshydratation

Cette étape vise à éliminer le fixateur par un rinçage à l'eau distillée. Cette dernière est suivie par une deshydratation effectuée par le passage des échantillons dans une série de bains d'éthanol à gradient croissant (70, 95 et 100 %).

C- Clarification

Au cours de cette étape les échantillons ont été clarifiés par passage dans deux bains de xylène. Cette clarification consiste en un remplacement du déshydratant par une substance miscible avec la paraffine ce qui rend les échantillons plus transparents

D- Inclusion et Confection des coupes

Les spécimens ont été mis dans des cassettes pour être imprégnés à chaud par une paraffine de routine, ensuite, la paraffine a été coulée au quart dans les moules en acier

inoxydable chauffés à 60°C et les fragments de tissus y ont été déposés. Après solidification de la paraffine, les blocs formés ont été congelés à -20°C pour être réduits en coupe microscopiques d'épaisseur de 5 µm grâce à un microtome (Leika RM2145, Allemagne). Les coupes sont ensuite collées sur des lames et séchées à température ambiante jusqu'au moment de la coloration.

E- Coloration

Elle consiste à un déparaffinage et une réhydratation, cette étape a été assurée par une succession de bains d'alcools de titre décroissant, après cette réhydratation les coupes subissent une coloration en utilisant deux colorants qui permettent de mettre en évidence la morphologie cellulaire et tissulaire : l'hématoxyline basique qui colore le noyau acide en bleu-violet et l'éosine acide qui colore le cytoplasme basique en rose.

E- Montage

Le montage de la lame-lamelle se fait en déposant une goutte de baume de Canada, ensuite la lecture a été réalisée à l'aide d'un microscope trinoculaire (Primo Star-Zeiss) couplé à une caméra de type AxioCam ERc5s.

II.6.10. Recherche et dénombrement de quelques bactéries représentatives du microbiote intestinal du rat Wistar sous DMH et régime hyper-gras.

Afin d'évaluer l'effet préventif de l'écorce de grenade seule ou associée aux probiotiques via la modulation et la restauration de la flore intestinale, contre des lésions cancéreuses chimio-induites. Des analyses de routine de la microflore intestinale ont été réalisées, celle-ci se limitent aux germes cultivables et elles visent la recherche, l'identification et le comptage des bactéries au niveau fécal. Pour se faire, 1g de matière fécale fraîche à l'émission a été prélevée. Les principales bactéries de la flore intestinale recherchées dans les prélèvements fécaux sont : *Lactobacillus* sp. ; *Bifidobacterium* sp.; *Escherichia coli* ; *Bacteroides* sp. Le dénombrement des bactéries est exprimé en Log₁₀UFC/g de matière fécale.

II.6.10.1. Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli*

Le dénombrement d'*E.coli* a été effectué dans le contenu fécal des rats, cette technique consiste à dissoudre 1g de matière fécale dans 9 mL de l'eau physiologique à 0.9%. La solution a été homogénéisée à l'aide d'un vortex, et laisser un bon moment pour précipiter. À partir de cette dernière, des dilutions décimales ont été préparées jusqu'à 10⁻¹⁰ ensuite pour chaque dilution, des étalements en surface ont été réalisés sur la gélose de Mac Conkey

(Parodonsia, Conda SA, Espagne). Les boîtes de Pétri ont été étalées puis incubées à 37°C pendant 24 h. Cette étape a été suivie par des observations macroscopiques des colonies bactériennes basées sur l'étude des caractères cultureux (aspect des colonies, couleur, taille, forme...). Un comptage, une identification microscopique et biochimique, par le biais d'une galerie Api 20E, des colonies ont été réalisées (**Chang et al., 2012**).

• **Identification d'*Escherichia coli* par la galerie Api 20E (Biomerieux, France).**

La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un signe indique la nature du test. Les microtubes sontensemencés avec une suspension bactérienne standardisée à l'échelle de 0.5 Mc Farland. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La galerie Api 20E permet d'effectuer les tests suivants : Ortho-Nitrophenyl-β Galactosidase (ONPG), Activité Arginine Dihydrolase (ADH), Ornithine Décarboxylase (ODC), Lysine Décarboxylase (LDC), Citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction de thiosulfate (H₂S), synthèse d'une uréase (URE), recherche de la tryptophane désaminase (TDA), et du pouvoir indologène (IND), production de l'acétone ,vogue proskauer (VP), gélatinase(GEL), recherche des glucides : glucose (GLU) ,arabinose (ARA) ,mannose (MAN), inositol (INO), Sorbitole (SOR), Rhamnose (RHA), saccharose (SAC),méliloïdose (MEL),amygdaline (AMY) (voir **Annexe VI**).

II.6.10.2. Dénombrement de *Bacteroides* sp.

Ces bactéries constituent une partie importante de la microflore intestinale. Leurs dénombrements ont été faits de la même façon décrite précédemment. L'ensemencement se fait par étalement en profondeur de la gélose bactéroïdes-bile-esculine (BBE) modifiée additionnée de kanamycine a une concentration de 75µg /mL (p/v) (Sigma-aldrich, USA). L'incubation a été réalisée dans des conditions d'anaérobiose à 37°C pendant 72h en utilisant un générateur GasPak (GasPak System-Oxoid, Angleterre)(**Duerden, 1980**). Des tests cultureux, microscopiques et biochimiques ont été utilisés pour l'identification de ces bactéries.

II.6.10.3. Dénombrement de *Lactobacillus* sp.

La recherche de *Lactobacillus* consiste à ensemencer en profondeur la gélose de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Parodonsia, Conda SA, Espagne) à partir des dilutions décimales préparées comme décrit précédemment. L'ensemencement en profondeur a été suivi d'une incubation de 48 h et à 37°C (**Liong & Shah, 2006**). L'étude des caractères cultureux,

morphologiques et biochimiques via la galerie Api50 CH (Biomerieux, France) ont été réalisées.

• **Identification de *Lactobacillus* sp. par la galerie Api50 CH (Biomerieux, France)**

La galerie Api 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés. Les microtubes correspondants aux tests de fermentation sont remplis avec le milieu Api 50 CHL inoculé par la souche à tester. Un test positif se traduit par le virage au jaune de la couleur du contenu du tube qui témoigne de l'acidification du milieu après 24 et/ou 48 h d'incubation (McLeod et al ., 2008).

II.6.10.4. Dénombrement des *Bifidobacterium* sp.

Le dénombrement des *Bifidobacterium* s'effectue par étalement en masse sur milieu MRS Cystéiné (0.5% cystéine-HCl) à partir des dilutions décimales. Ensuite les boites de Pétri ont été incubées dans des conditions d'anaérobiose à 37°C (Grimm et al., 2015). Après 72 h d'incubation les colonies sont sélectionnées selon leurs aspects cultureux.

II.6.10.5. Tests d'identification des bactéries étudiées

L'identification bactérienne au cours de cette expérimentation a été confirmée physiologiquement et biochimiquement selon le manuel de Bergey de bactériologie systématique, Procaryotes (Cullimore, 2000).

• **Caractères macroscopiques**

Une observation macroscopique consiste à décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation (Taille, couleur, aspect, viscosité...ect).

• **Caractères microscopiques**

Elle a été effectuée sur un frottis bactérien préparé à partir des colonies en culture pure puis fixé et coloré par la méthode de Gram (voir Annexe VI)

• **Caractères biochimiques**

Les bactéries, *Bacteroides* et *Bifidobacterium* ont été identifiées par l'étude des caractères biochimiques. En effet, ces dernières sont capables d'effectuer une grande diversité de réactions biochimiques qui se traduisent par la production d'enzymes (catalase) et par le type nutritionnel (fermentation ou oxydation des sucres, production ou pas de gaz...ect).

- **Test de catalase**

- **Principe**

D'après **Larpent (1990)**, le test de catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme de catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène.

- **Technique**

Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte a été diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase (**Hariri et al .,2009**).

- **Test oxydase**

- **Principe**

Ce test met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome C réduit. Il consiste à mettre la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées (**Delarras, 2014**).

- **Technique**

Un disque d'oxydase a été imbibé par une goutte d'eau distillée stérile ensuite une partie de colonie a été déposée sur le disque à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile. Une coloration violet foncé apparait immédiatement sur le disque ou en quelque secondes (**Delarras, 2014**).

- **Test d'Ortho-Nitrophenyl- β Galactosidase (ONPG)**

- **Principe**

L'ortho-nitrophenyl- β -D galactosidase (ONPG) est un analogue structural du lactose. Ce substrat synthétique incolore peut être scindé en galactose et en orthonitrophénol en présence d'une des enzymes appelées ONPG hydrolase (**Delarras, 2014**).

- **Technique**

Deux à trois disques d'ONPG commerciales stériles ont été ajoutés à une suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique stérile puis incubée à 37°C pendant 24h.

L'apparition d'une couleur jaune indique la capacité des bactéries à synthétiser la β -galactosidase (Delarras, 2014).

• **Milieu Mannitol Mobilité**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité bactérienne. Pour se faire, les souches étudiées ont été ensemencées dans le milieu par piqûre centrale, et incubées à 30°C pendant 18 à 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol et une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Marchal et al., 1991).

• **Test Urée-Indole**

Le milieu Urée-Indole permet en 24h de réaliser deux tests biochimiques qui interviennent dans l'identification des bactéries, il s'agit du test uréase et indole. Ce test consiste à ensemencer une colonie bactérienne à l'aide d'une anse en platine stérile dans le milieu urée-indole, et l'incuber à 37°C pendant 24 h (Delarras, 2007).

• **Recherche des Activités Arginine Dihydrolase (ADH), Lysine Décarboxylase (LDC) et Ornithine Décarboxylase (ODC).**

- **Principe**

Ce test permet de déterminer la capacité des bactéries à dégrader les acides aminés (soit la lysine, l'ornithine, ou l'arginine). La culture dans le milieu se manifeste par un virage au jaune du milieu dû à la fermentation de glucose, et si l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après 24h d'incubation à 37°C, un milieu violet correspond à une réaction positive (Hariri et al., 2009).

- **Technique**

Un milieu Mueller additionné d'un acide aminé a été ensemencé par une suspension bactérienne, puis incubé à 37°C pendant une durée comprise entre 24h à 48h (Hariri et al., 2009).

II.7. Traitement statistique des résultats

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM (*Erreur Standard*). L'analyse statistique des données a été conduite en utilisant le logiciel STATISTICA (version 8.0, Statsoft, Tulsa. OK). Pour l'étude in Vivo, la comparaison des

moyennes des six groupes de rats a été réalisée via le test ANOVA à un facteur. Ce dernier a été complété par le test tukey afin de classer et comparer les moyennes.

Les essais de l'étude in Vitro ont été indépendamment répétées 03 fois, la comparaison des moyennes a été effectuée via le test ANOVA à un facteur et complétée par le test tukey. On considère la différence est significative à $P < 0.05$.

La présentation graphique a été réalisée à l'aide de logiciel GraphPad Prism version 8.3.1 (GraphPadSoftware, Inc., San Diego, USA).

CHAPITRE III

RESULTATS

Chapitre III. Résultats

III.1. Rendement d'extraction des polyphénols d'écorce de grenade

Les rendements obtenus après extraction des composés phénoliques de l'écorce de grenade en utilisant le méthanol ou l'éthanol pur comme solvant d'extraction sont représentés dans le tableau 3. Les résultats dévoilent que l'extrait méthanolique issu de l'écorce de grenade (EMEG) présente un rendement élevé estimé à 41 ± 1.73 % par rapport à l'extrait éthanolique de l'écorce de grenade (EEEG) avec un pourcentage de 31 ± 2.47 %.

Tableau 3. Rendement d'extraction des composés phénoliques de l'écorce de grenade

Extraits de l'écorce de grenade	Rendement d'extraction (%)
Extrait méthanolique	41 ± 1.73^a
Extrait éthanolique	31 ± 2.47^b

*Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm Ecart type des trois essais indépendants (n=3).
Les lettres (a, b) sont significativement différentes*

III.2. Teneurs en substances phénoliques des extraits d'écorce de grenade

L'analyse quantitative des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits issus de l'écorce est déterminée à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g de la matière sèche (mg EAG/g MS) et en mg équivalent de quercétine par g de la matière sèche (mg EQ/g MS), respectivement. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 18.

La quantification des composés phénoliques montre que les deux extraits contiennent les mêmes teneurs en polyphénols soit 379.61 ± 31.71 mg EAG/g MS pour l'extrait au méthanol et 381.51 ± 32.39 mg EAG/g MS pour l'extrait éthanolique. Aucune différence significative entre ces deux extraits n'est décelée. De manière similaire, le dosage des taux des flavonoïdes de deux extraits méthanolique et éthanolique indiquent aussi des teneurs identiques enregistrées à 50.95 ± 11.57 mg EQ/g MS et 53.64 ± 12 , respectivement.

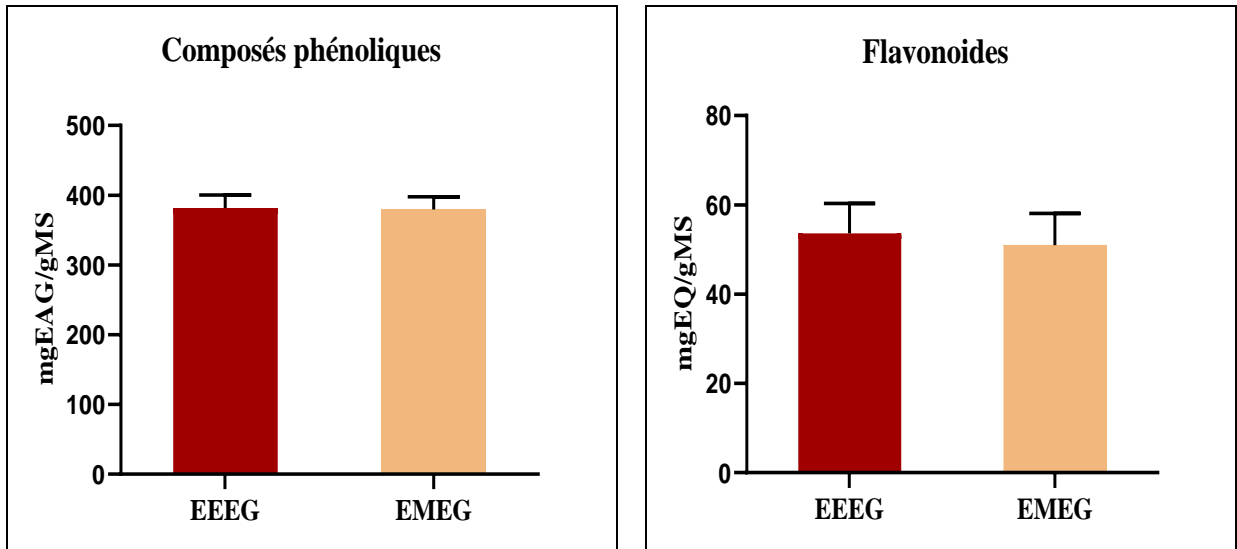


Figure 18 : Teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm Ecart type des trois essais indépendants ($n=3$)
EMEG : Extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EEEG : Extrait éthanolique d'écorce de grenade ;
mg EAG /g MS : mg Equivalent d'Acide Gallique par g de la matière sèche ; mg EQ/g MS : mg équivalent de Quercétine par g de la matière sèche.

III.3. Profil chromatographique des extraits phénoliques d'écorce de grenade

Les profils chromatographiques de l'analyse par HPLC des EMEG et EEEG sont présentés dans la figure 19.

Les chromatogrammes obtenus des composés phénoliques de deux extraits de l'écorce de grenade sont comparable. Tandis que les aires de pics des différents composés varient d'un extrait à l'autre. L'identification des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes a été effectuée par la comparaison du temps de rétention (R_t) des pics trouvés pour chaque extrait avec ceux des standards. Cette identification a permis de révéler la présence des molécules les plus abondantes dans les deux extraits, telles que l'acide gallique, la punicalagine, la rutine, l'acide syringique et la quercétine. Il est à noter qu'au cours de cette analyse, nous n'avons pas pu identifier certains composés phénoliques présents dans les extraits de l'écorce de grenade par manque des étalons adéquats.

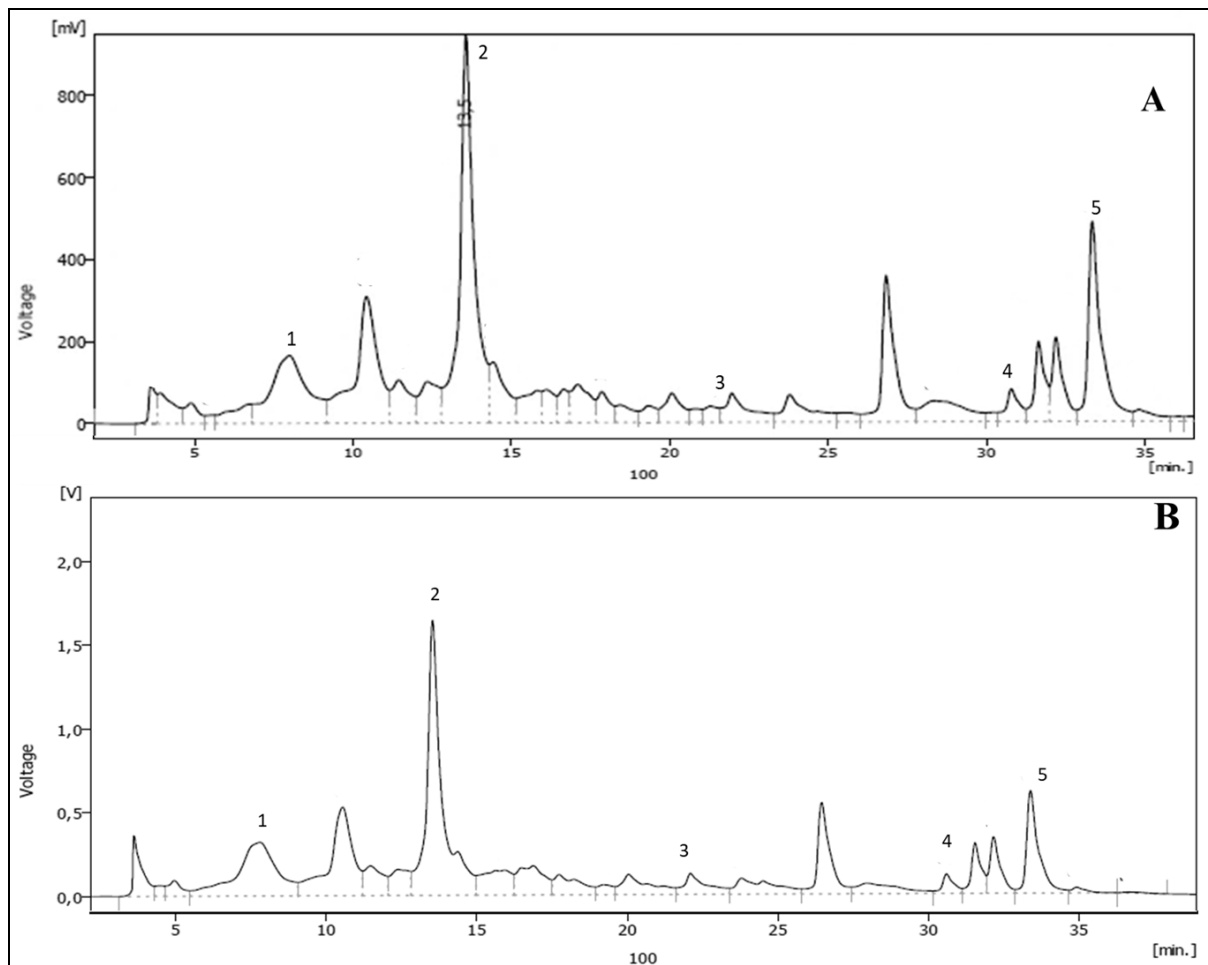


Figure 19 : Chromatogrammes de l'analyse HPLC des extraits de l'écorce de grenade **A)** Extrait éthanolique **B)** Extrait méthanolique.

1: Acide gallique; 2 : Punicalagine ; 3: Acide Syringique; 4: Rutine ; 5: Quercetine

III.4. Activité antioxydante in Vitro des extraits phénoliques d'écorce de grenade

Les résultats concernant l'activité réductrice des extraits d'écorce de grenade, acide gallique, acide ascorbique et la quercetine sont représentés dans la figure 20.

Les résultats obtenus démontrent que la capacité réductrice des extraits d'écorce est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits (Effet dose-dépendant). Ceci s'explique par la contribution des antioxydants donneurs des électrons, présents dans les deux extraits. On constate que le pouvoir réducteur d'EEEG est supérieur de manière significative à celui enregistré avec EMEG. On note des CE_{50} de l'ordre de 58.42 ± 0.21 et $80 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, respectivement.

Néanmoins, ce pouvoir de réduction du fer reste faible par rapport à celui des antioxydants standard (l'acide gallique, l'acide ascorbique et quercetine). Ceci est remarqué

par des CE₅₀ classées comme suit : Acide gallique (17.56±0.44µg/mL), l'acide ascorbique (44.20±0.84 µg/mL) et Quercetine (35.76± 0.84) (**tableau 4**).

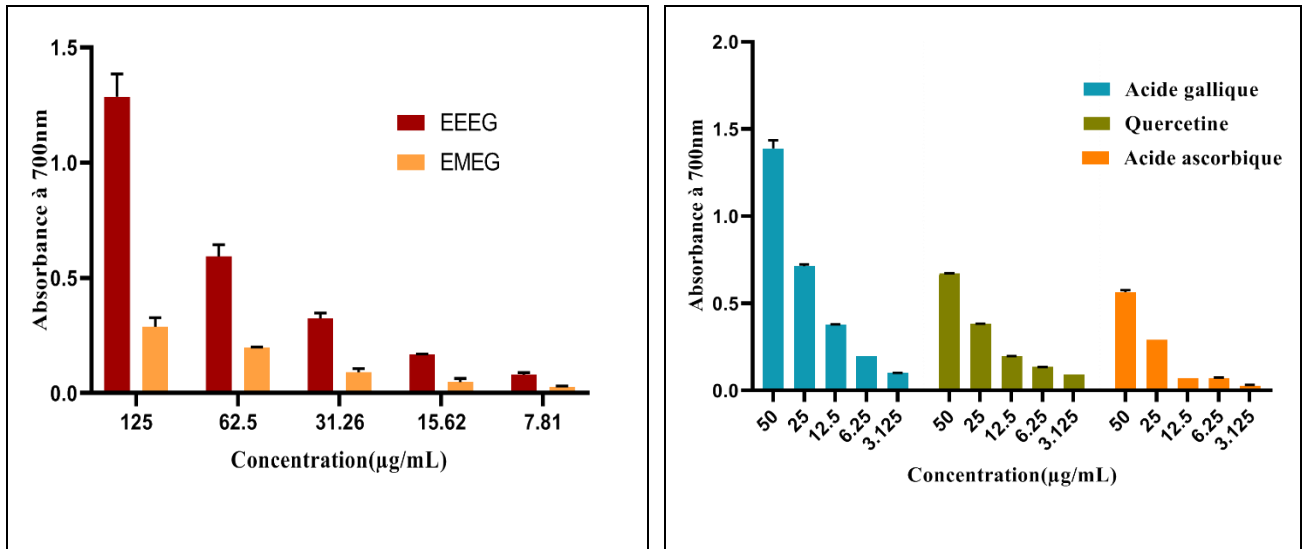


Figure 20. Pouvoir réducteur des extraits d'écorce de grenade (A) pouvoir réducteur des standards (B) (méthode de FRAP).

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± Ecart type des trois essais indépendants (n= 3)

EMEG : Extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EEGE : Extrait éthanolique d'écorce de grenade

Tableau 4. Valeurs des CE₅₀ des extraits d'écorce de grenade et des antioxydants standards

Extraits et antioxydants standards	CE ₅₀ (µg/mL)
EEEG	58.42 ± 0.21 ^a
EMEG	80 ± 1.00 ^b
Acide gallique	17.56 ± 0.44 ^c
Quercetine	35.76 ± 0.84 ^d
Acide Ascorbique	44.20 ± 0.84 ^e

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± Ecart type des trois essais indépendants (n= 3)

EMEG : Extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EEGE : Extrait éthanolique d'écorce de grenade

Les lettres différentes (a,b,c,d,e) indiquent des différences significatives (p<0.05).

III.5. Activité antibactérienne des extraits phénoliques d'écorce de grenade

III.5.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par diffusion sur gélose

Les résultats du test de la sensibilité bactérienne aux EEEG et EMEG sont indiqués dans le tableau 5. Ces résultats indiquent que les deux extraits exercent un effet inhibiteur sur la croissance de l'ensemble des souches étudiées : *E.coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. cereus*. Les diamètres des zones d'inhibition sont situés entre 9 et 20.5 mm pour EMEG et entre 7.67 et 18.25 mm pour l'EEEG.

L'effet inhibiteur observé est reflété par la diminution des diamètres des zones d'inhibition qui en corrélation avec la concentration de l'extrait appliqué (EEEG ou EMEG). En parallèle, des disques d'antibiotique de la Tétracycline (20µg/mL) et de Chloramphénicol (30 µg/mL) ont été utilisés pour étudier le comportement de ces souches bactériennes vis-à-vis ces antibiotiques. Les résultats obtenus dévoilent que le Chloramphénicol exerce un effet inhibiteur sur l'ensemble des souches, les diamètres des zones d'inhibition sont situés entre 13 et 33.66 mm. Il va de même pour la Tétracycline, celui-ci inhibe toutes les cultures bactériennes des souches testées, les diamètres obtenus sont compris entre 12 et 28.33 mm.

III.5.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).

Les résultats d'évaluation de CMI et CMB par la méthode de microdilution évoquent que les deux extraits de l'écorce de grenade entraînent des spectres d'activité antibactérienne différents. L'effet inhibiteur le plus puissant d'EEEG a été observée contre *S. aureus* et *B. subtilis* avec une CMI de 3.9 mg/mL suivie par *E.coli* avec une CMI de 7.81 mg/mL. Parallèlement, la souche de *S.aureus* est très sensible à L'EMEG ceci est reflété par une CMI de 0.97 mg/mL et une CMB de 7.81mg/mL, en comparaison avec *E.coli*, *P.aeruginosa* et *B.cereus*, les CMI de ces souches obtenus sont entre 7.81 et 15.62 mg/mL alors que les CMB sont entre 62.5 et 250 mg/mL.

Tableau 5 : Diamètres des zones d'inhibitions induits par les deux extraits méthanolique et éthanologique vis-à-vis des souches bactériennes étudiées.

EEEG (mg/mL)	Bactéries				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
250	14.17 ± 0,29 ^{aA}	15.33 ± 0.58 ^{aA}	18.25 ± 0,5 ^{bA}	11 ± 1 ^{bA}	12 .5 ± 0.57 ^{bA}
125	12 ± 1 ^{aA}	12.67 ± 0.58 ^{aA}	15.75 ± 0,9 ^{bA}	8.67 ± 0.58 ^{cA}	11.5 ± 0.57 ^{cA}
62.5	10±1 ^{aA}	10.67 ± 0.58 ^{aA}	14.75 ±0,5 ^{bA}	7.67 ± 0.58 ^{cA}	9.25±0.5 ^{cA}
EMEG (mg/mL)					
250	19.67±2.52 ^{aB}	20 ±1.73 ^{aB}	20.5±0.75 ^{aA}	13± 1 ^{bB}	13.5±0.57 ^{bA}
125	14.33 ± 0.57 ^{aB}	17.33± 0.58 ^{bB}	16.66±0.57 ^{bA}	11.33 ± 0.58 ^{cB}	11.25±0.5 ^{cA}
62.5	10.33± 1 ^{aA}	12± 1 ^{aA}	15.33±0.57 ^{bB}	9.33±1.15 ^{cB}	9±00 ^{cA}
Antibiotiques					
Chloramphenicol	33.66 ^{aC} ±0.5	30 ^{aC} ±0.75	20.75 ^{bA} ±0.5	21 ^{bC}	13 ^{cA}
Tetracycline	28.33 ^{aC} ±0.5	19 ^{bB} ±0.5	18.75 ^{bA} ±0.5	15 ^{bC}	12 ^{cA}

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± Ecart type des trois essais indépendants (n= 3);
EMEG : Extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EEEG : Extrait éthanologique d'écorce de grenade
Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) dans la même ligne indiquent des différences significatives (p<0.05)
Les moyennes portant des lettres différentes (A, B, C) dans la même colonne indiquent des différences significatives (p<0.05).

Tableau 6. Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide des extraits méthanolique et éthanologique vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Bactéries	EEEG (mg/mL)		EMEG (mg/mL)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>B.subtillis</i>	3.9	62.5	3.9	31.25
<i>S.aureus</i>	3.90	31.25	0.97	7.81
<i>B. cereus</i>	7.81	62.5	7.81	62.5
<i>P. aeruginosa</i>	15.62	250	15.62	250
<i>E.coli</i>	7.81	125	7.81	62.5

EEEG : Extrait éthanologique de l'écorce de grenade ; EMEG : Extrait méthanolique de l'écorce de grenade

III.6. Effet in Vivo de l'écorce de grenade (*Punica granatum L.*) combinée ou non à des souches bénéfiques sur les lésions précancéreuses chimio-induites chez le rat sous régime hyper-gras.

III.6.1. Poids corporel

Au début de l'expérimentation, les rats utilisés avaient un poids initial moyen et homogène de 231.9 ± 6.76 g. Ces derniers ont reçus pendant 16 semaines soit un régime standard, soit un régime hyper-gras supplémenté ou non en écorce de grenade (sous forme de poudre) associée ou non aux probiotiques. Le gain de poids, au cours de l'étude, chez les six lots de rats, est représenté dans la figure 21. Les résultats indiquent que le gain de poids constaté chez les rats recevant le régime hyper-gras (groupes G2 et G4) est significativement supérieur ($P < 0.01$) à celui observé chez les rats recevant le régime standard (groupes G1 et G3). Cependant, le traitement par l'écorce de grenade combinée au non aux probiotiques chez les groupes des rats sous régime hyper-gras et traités par DMH (G5 et G6), réduit la masse corporelle de 26 et 28% respectivement, et ce en comparaison avec le groupe des rats traité par DMH et recevant le régime hyper-gras seulement (G4).

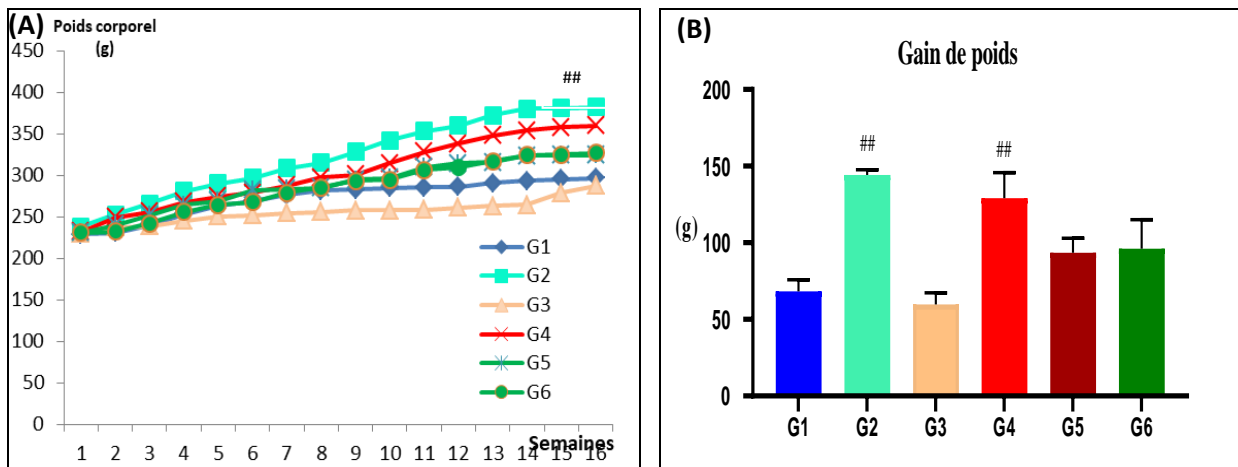


Figure 21 : Evolution du poids corporel (A) et le gain de poids (B) des rats pendant 16 semaines d'expérimentation

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm erreur standard (SEM) avec $n=6$, $^{##}P < 0.01$ différence significative par rapport au témoin (G1).

G1: non traité par DMH et sous régime SD; G2: non traité par DMH et sous régime HG; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.6.2. Evaluation de la nourriture ingérée et l'apport calorique

Les résultats obtenus révèlent que l'exposition des rats au régime hyper-gras (G2 et G4) entraîne une augmentation significative ($p < 0.01$) de l'apport énergétique par rapport aux rats ayant reçus le régime standard (G1 et G3). Cependant, la supplémentation en écorce de grenade associée ou non à des bactéries bénéfiques, réduit de manière significative ($p < 0.01$) l'apport énergétique chez le groupe 5 et 6 en comparaison avec les rats traités par DMH et soumis au régime hyper-gras (G4).

En revanche, aucune différence significative dans la quantité de la nourriture ingérée n'a été révélée chez l'ensemble des groupes des rats (**fig. 22**).

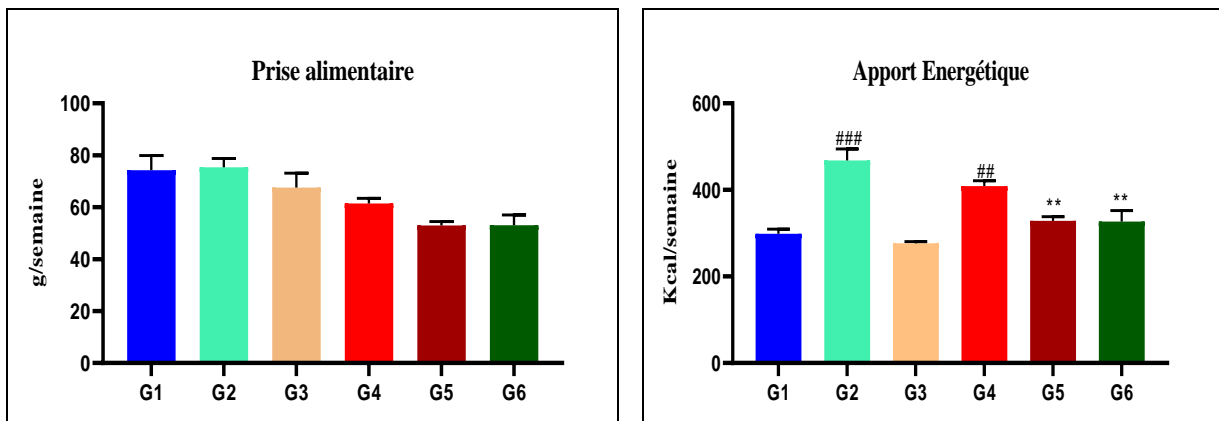


Figure 22: Nourriture ingérée (g) et Apport calorique (Kcal) des différents groupes durant les 16 semaines d'expérimentation

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ^{###} $P < 0.001$, ^{##} $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe G1. ^{**} $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe G4

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.6.3. Evaluation de poids des organes

Après 16 semaines d'expérimentation, le poids des organes chez les six groupes est présenté dans le tableau 7. Les résultats dévoilent que les rats soumis au régime hyper-gras traités ou non par DMH, possèdent une masse de tissu adipeux évaluée à TA = 6.16 ± 0.83 et supérieur de manière significative ($p < 0.01$) à celle des rats ayant reçus le régime standard (4.02 ± 0.22). Cependant, l'incorporation de l'écorce de grenade associée ou non aux probiotiques dans les régimes expérimentaux ne provoque aucune influence significative sur le poids des organes des rats en comparaison au groupe témoin (G4).

Tableau 7: Poids des organes des rats au moment du sacrifice

Organes (g)	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Colon	3.24 ± 0.12	3.61 ± 0.21	3.25 ± 0.23	3.53 ± 0.05	3.1 ± 0.11	3.46 ± 0.23
Foie	8.52 ± 0.40	9.36 ± 0.35	8.63 ± 0.47	9.85 ± 0.69	9.6 ± 0.06	9.78 ± 0.68
Tissu adipeux	4.02 ± 0.22	$6.16 \pm 0.83^{##}$	3.82 ± 0.17	$5.85 \pm 1.76^{##}$	4.5 ± 0.58	5.85 ± 0.97
Coeur	1 ± 0.08	1 ± 0.02	0.95 ± 0.12	1.03 ± 0.07	0.93 ± 0.03	1.03 ± 0.07
Reins	1.95 ± 0.13	2.13 ± 0.09	2 ± 0.08	2.15 ± 0.12	1.75 ± 0.07	1.81 ± 0.17

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, $^{##}P < 0.01$ différence significative par rapport au témoin (G1).

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.7. Effets in Vivo de l'écorce de grenade associée ou non à des souches bénéfiques sur certains paramètres sériques chez le rat sous régime hyper-gras.

III.7.1. La triglycéridémie

Au niveau sérique, les résultats d'évaluation de l'impact des régimes expérimentaux sur les paramètres biochimiques montrent une augmentation significative ($p < 0.01$) des teneurs triglycérides observée chez les rats recevant le régime hyper-gras (G2) en comparaison aux rats sous régime standard (G1) (**fig.23**).

Néanmoins, la supplémentation de régime hyper-gras en écorce de grenade seul ou associée aux probiotiques chez les groupes G5 et G6, traités au DMH, induit une réduction significative ($p < 0.01$) des taux des triglycérides évalués de 26 et 29%, respectivement.

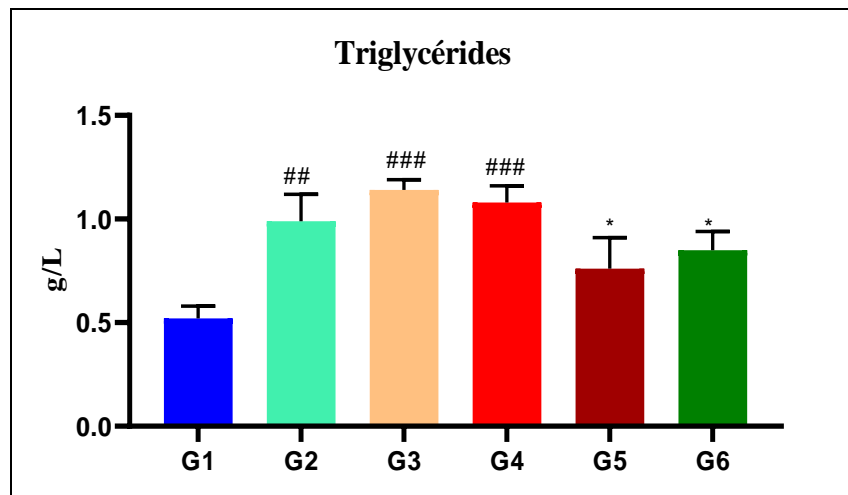


Figure 23 : Teneurs sériques en triglycérides (g/L) chez les différents groupes de rat après 16 semaines d'expérimentation

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe témoin (G1). * $P < 0.05$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.7.2. Les concentrations en cholestérol total (CT)

Les résultats d'évaluation des teneurs en cholestérol indiquent une variation significative ($p < 0.001$) chez les rats nourris par un régime hyper-gras (G2 et G4), celle-ci est reflétée par une augmentation de 115% par rapport au groupe témoin (G1). Cependant, l'administration de l'écorce de grenade seul ou associée aux probiotiques induit une diminution significative ($p < 0.05$) de la cholestérolémie évaluée à 36% chez le groupe G5 et 40% chez le groupe G6 en comparaison avec le groupe témoin positif (G4) (**fig.24**).

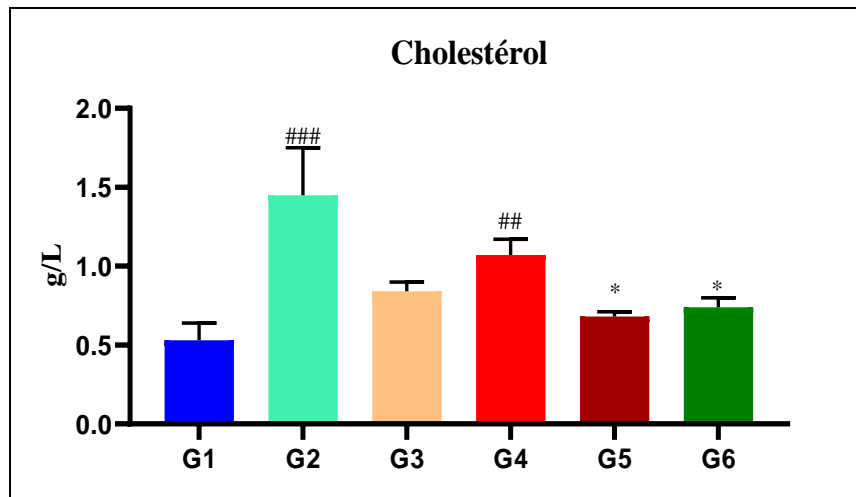


Figure 24 : Teneurs sériques en cholestérol total (g/L) chez les différents groupes de rat après 16 semaines

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ### $P < 0.001$ et ## $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe témoin G1, * $P < 0.05$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.7.3. Le cholestérol HDL (C-HDL)

Les résultats obtenus après 16 semaines d'expérimentation indiquent aucune variation significative de la teneur en C-HDL observée chez les rats des groupes G2, G3, G4, G5 et G6 *versus* des teneurs en C-HDL chez les rats du groupe témoins négatif (G1) (**fig. 25**).

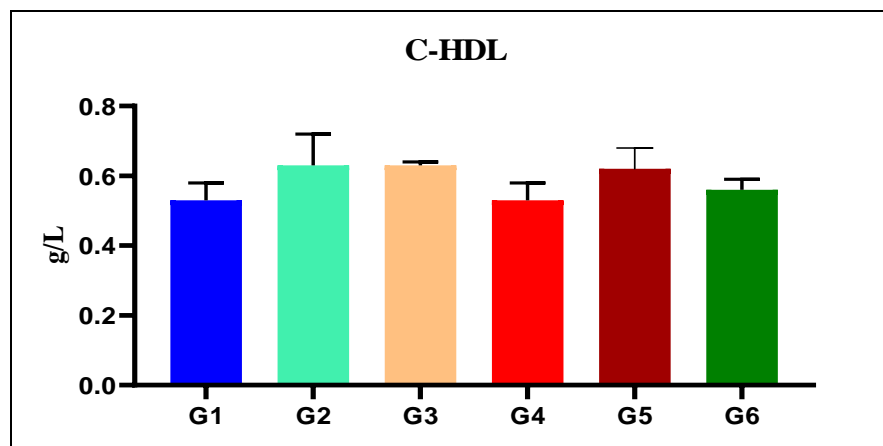


Figure 25 : Teneurs sériques en C-HDL (g/L) chez les différents groupes de rat après 16 semaines d'expérimentation.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$;

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique

III.7.4. Le cholestérol LDL (C-LDL)

Les résultats de détermination des concentrations de C-LDL présentent une diminution significative ($p < 0.01$) chez les rats ayant reçus le régime hyper-gras incorporé soit d'écorce de grenade (48%) (G5) ou écorce de grenade associée aux probiotiques (64%) (G6) et ce par rapport aux rats traités par le DMH et soumis au régime hyper-gras sans supplémentation (G4) (fig. 26).

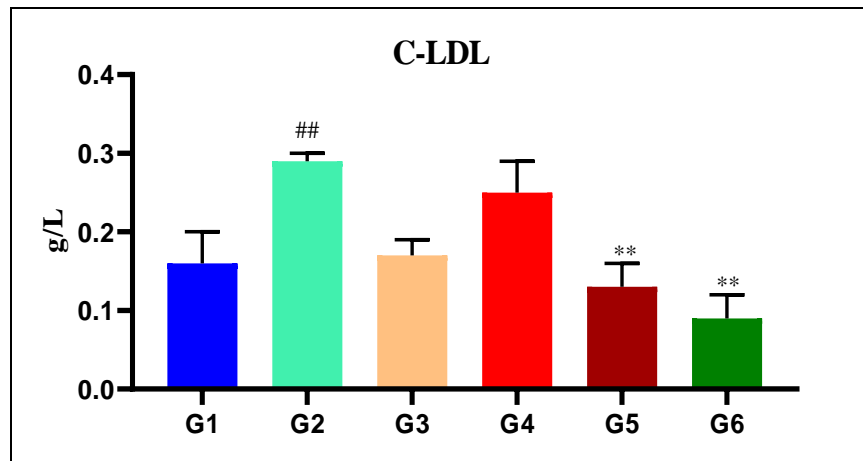


Figure 26 : Teneurs sériques en C-LDL (g/L) chez les différents groupes de rat après 16 semaines.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ## $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe témoin G1, ** $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.7.5. Activités des enzymes de transaminases

L'activité enzymatique des ASAT et ALAT subissent une variation chez les rats soumis au régime hyper-gras (G2 et G4), on constate une élévation de 20% du ASAT et de 59% de l'ALAT et ce en comparaison avec le groupe témoin (G1). Cependant, une réstoration significative ($p < 0.01$) de l'activité de ces enzymes est révélée chez les rats traités par le DMH et soumis à un régime hyper-gras incorporé d'écorce de grenade combinée ou non aux probiotiques (G5 et G6) *versus* le groupe témoin positif (G4) (fig. 27).

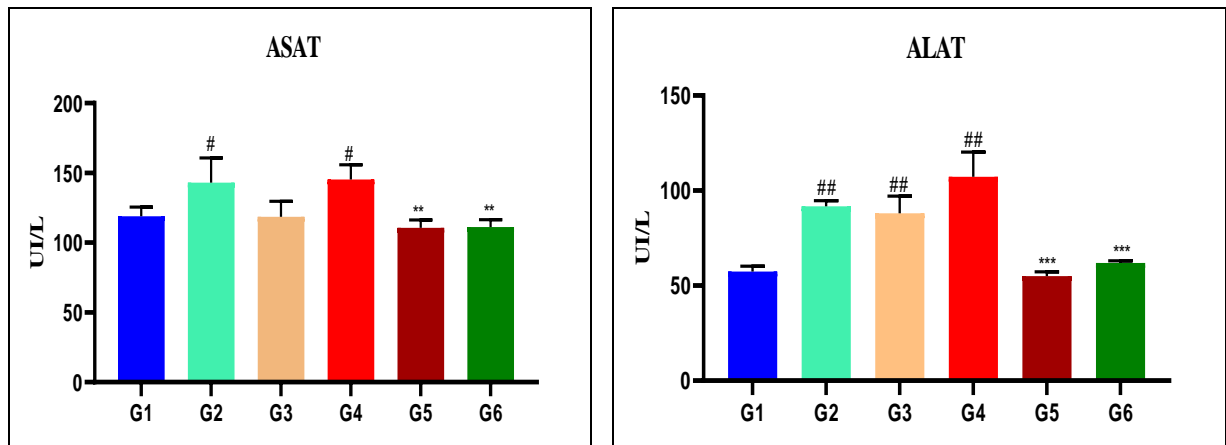


Figure 27: Activités enzymatiques (UI/L) des ASAT et ALAT après 16 semaines d'expérimentation.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ^{##} $P < 0.01$ et [#] $P < 0.05$ différence significative par rapport au témoin G1, ^{***} $P < 0.001$ et ^{**} $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.8. Effets in Vivo de la poudre d'écorce de grenade associée ou non à des souches bénéfiques sur le stress oxydatif chez le rat sous régime hyper-gras

III.8.1. Pouvoir réducteur total

III.8.1.1. Pouvoir réducteur plasmatique

Les résultats du pouvoir réducteur total sont représentés dans la Figure 28. Ces derniers dévoilent que ce paramètre est significativement inférieur ($p < 0.01$) chez les rats de deux groupes de témoin positif ayant reçu l'injection de DMH (G3 et G4), à celui des rats du groupe témoin négatif non traités par DMH (G1). Toutefois, l'incorporation de l'écorce de grenade dans les régimes expérimentaux additionnés ou non en probiotiques (G5 et G6), influence de manière significative le pouvoir réducteur. En effet, ce dernier augmente de 88% chez le groupe G5 et de manière significative ($p < 0.001$) en comparaison avec le groupe G4. Il va de même pour le pouvoir réducteur plasmatique des rats constituant le groupe G6 (**fig.28**).

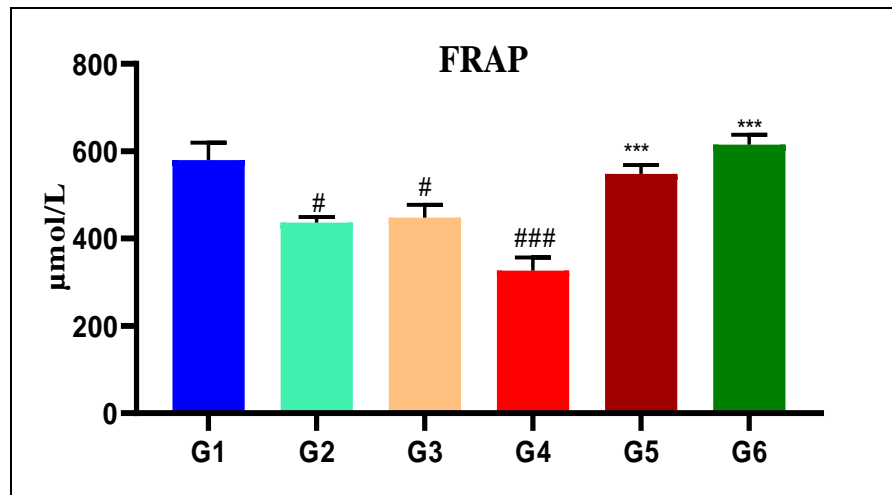


Figure 28 : Teneurs du pouvoir réducteur total au niveau plasmatique ($\mu\text{mol/L}$) des différents groupes après 16 semaines d'expérimentation

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ### $P < 0.001$ et # $P < 0.05$ différence significative par rapport au témoin (G1), *** $P < 0.001$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.8.1.2. Le pouvoir réducteur total tissulaire

Au niveau hépatique, le pouvoir réducteur a augmenté de 45% et 31%, respectivement chez les groupes G5 et G6 comparés au groupe G4. De manière similaire, une hausse de ce paramètre a été constatée au niveau colique, cette dernière est évaluée à 44% chez les rats du groupe G5 et de 46% chez le groupe G6 *versus* le groupe témoin positif traité par DMH(G6) (tableau 8).

Tableau 8 : Le Pouvoir réducteur tissulaire (Foie et côlon) (mmol/g de tissu) chez les différents groupes de rats après 16 semaines d'expérimentation.

Groupes	Pouvoir réducteur hépatique	Pouvoir réducteur colique
G1	9.35 \pm 0.57	10.22 \pm 0.24
G2	8.47 \pm 0.06	8.11 \pm 0.16###
G3	8.18 \pm 0.18#	7.97 \pm 0.33###
G4	5.32 \pm 0.07###	7.87 \pm 0.23###
G5	7.72 \pm 0.34**	11.36 \pm 0.38***
G6	6.97 \pm 0.37 ***	11.55 \pm 0.32***

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ### $P < 0.001$ et # $P < 0.05$ différence significative par rapport au témoin (G1), *** $P < 0.001$ et ** $P < 0.01$ différence significative par rapport au groupe G4. G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.8.2. Concentrations en Thiols

III.8.2.1. Concentrations en Thiols plasmatiques

Les résultats d'évaluation de l'oxydation protéique indiquent que l'addition de l'écorce de grenade et des probiotiques dans les régimes expérimentaux induit une augmentation significative des groupements thiols (SH) évaluée à 67 et 75% avec un $p < 0.001$, et ce chez les rats du groupe G5 et G6, respectivement en opposition avec le groupe G4 (**fig.29**). Ceci indique un effet protecteur de la supplémentation d'écorce de grenade combinée aux probiotiques vis-à-vis des altérations oxydatives protéiques.

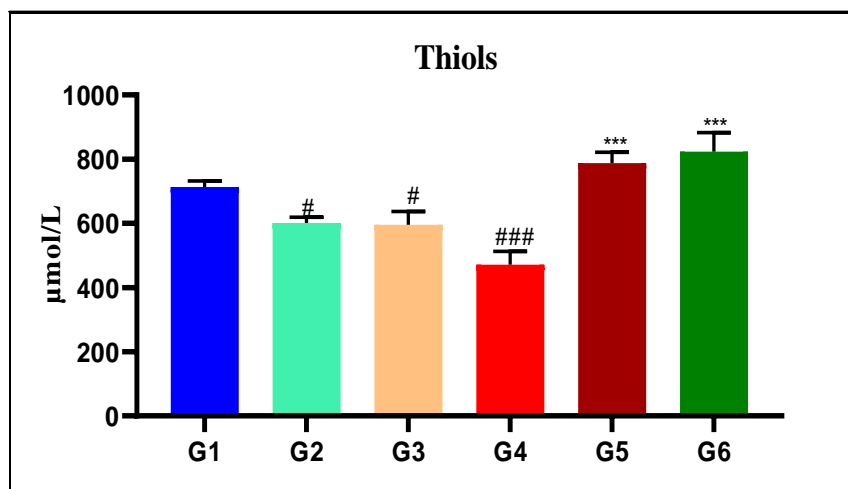


Figure 29: Teneurs des groupements thiols au niveau plasmatique ($\mu\text{mol/L}$) des différents groupes après 16 semaines d'expérimentation

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ### $P < 0.001$ et # $P < 0.05$ différence significative par rapport au témoin G1, *** $P < 0.001$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ; G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique

III.8.2.2. Concentrations en Thiols tissulaire

Une augmentation significative des groupements thiols au niveau hépatique et colique est observée chez les rats des groupes G5 et G6. Cette augmentation est estimée à 184%, 79% dans le foie et de 25%, 35% au niveau du colon, respectivement *versus* le groupe G4 (**tableau 9**).

Tableau 9 : Oxydation des groupements thiols hépatiques et coliques (mmol/g de tissu) chez les différents groupes de rats après 16 semaines d'expérimentation.

<i>Groupes</i>	<i>SH Foie</i>	<i>SH colon</i>
G1	5.48 ± 0.22	6.68 ± 0.42
G2	4.95 ± 0.57	5.31 ± 0.12 [#]
G3	3.36 ± 0.36 [#]	4.18 ± 0.02 [#]
G4	4.37 ± 0.27	5.32 ± 0.01 [#]
G5	9.96 ± 0.26***	6.75 ± 0.59*
G6	7.85 ± 0.5***	7.33 ± 0.6**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM avec n=6, [#]P < 0.05 différence significative par rapport au témoin G1. ***P < 0.001, **P < 0.01 et *P < 0.05 différence significative par rapport au groupe G4.
SH: groupements thiols.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ;G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.8.3. Niveau des TBARS

III.8.3.1.Teneur en TBARS plasmatique

Les résultats d'évaluation des teneurs en TBARS sont indiqués dans la figure 30, ces derniers montrent que le traitement par DMH, induit chez les rats nourris au régime standard (G3) ou hyper-gras (G4) une augmentation significative (p<0.001) des concentrations plasmatiques en malonaldéhyde (MDA) obtenues et ce en les opposants aux concentrations en MDA chez les groupes témoins négatifs non traités par DMH (G1 et G2). Cependant, on constate une réduction significative (p<0.001) de 55 et de 66% des taux de MDA chez les groupes G5 et G6 respectivement, en comparaison avec le groupe témoin positif traité par DMH (G4) (**fig 30**).

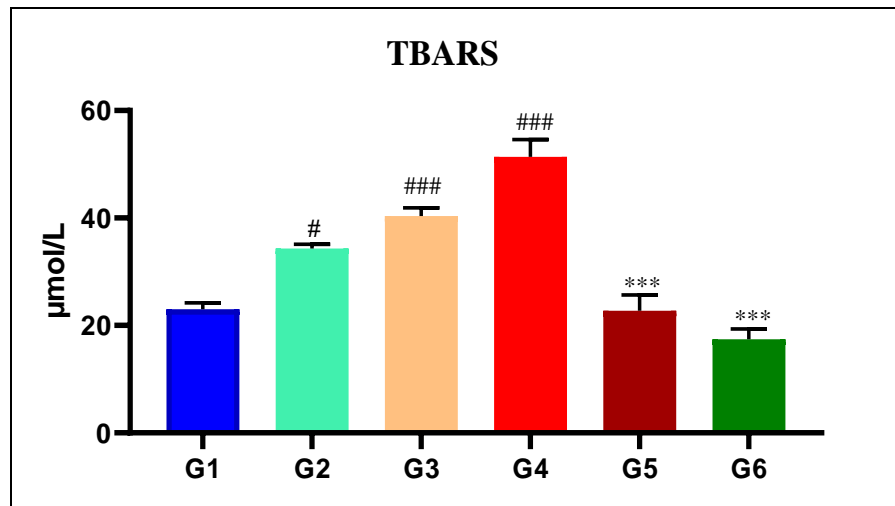


Figure 30: Teneurs en TBARS plasmatique (µmol/L)

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ### $P < 0.001$ et # $P < 0.05$ différence significative par rapport au témoin G1, *** $P < 0.001$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ;G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.9. Aspect des lésions précancéreuses chimio-induites en tant que modèle de cancer expérimental du côlon.

L'examen histologique des colons issus des rats témoins négatifs non traités par DMH (G1 et G2) a montré une architecture histologique homogène ; portent une muqueuse de type colique régulier, constituée de glande de structure homogène (**fig.31A-B**). Cependant, le groupe témoin positif, traité par DMH et sous régime hyper-gras a révélé soit un carcinome intra-muqueux ou une dysplasie de haut grade (**fig.31D**). Cette dernière est caractérisée par des désorganisations de l'architecture des cryptes, stratification nucléaire qui atteint le pôle apical des cellules, une perte de la mucosecrétion et par la présence des figures mitotiques. Par ailleurs, chez certains rats constituant le groupe G5 (**fig.31E**) présentent des colons avec une dysplasie de bas grade et ce en comparaison avec celui de groupe G4. Alors que, la supplémentation de probiotique chez les rats recevant le régime hyper-gras incorporé d'écorce de grenade restaure l'aspect histologique normale de la muqueuse colique celle-ci est composée de glande de structure homogène par rapport aux rats du groupe G4 (**fig.31F**).

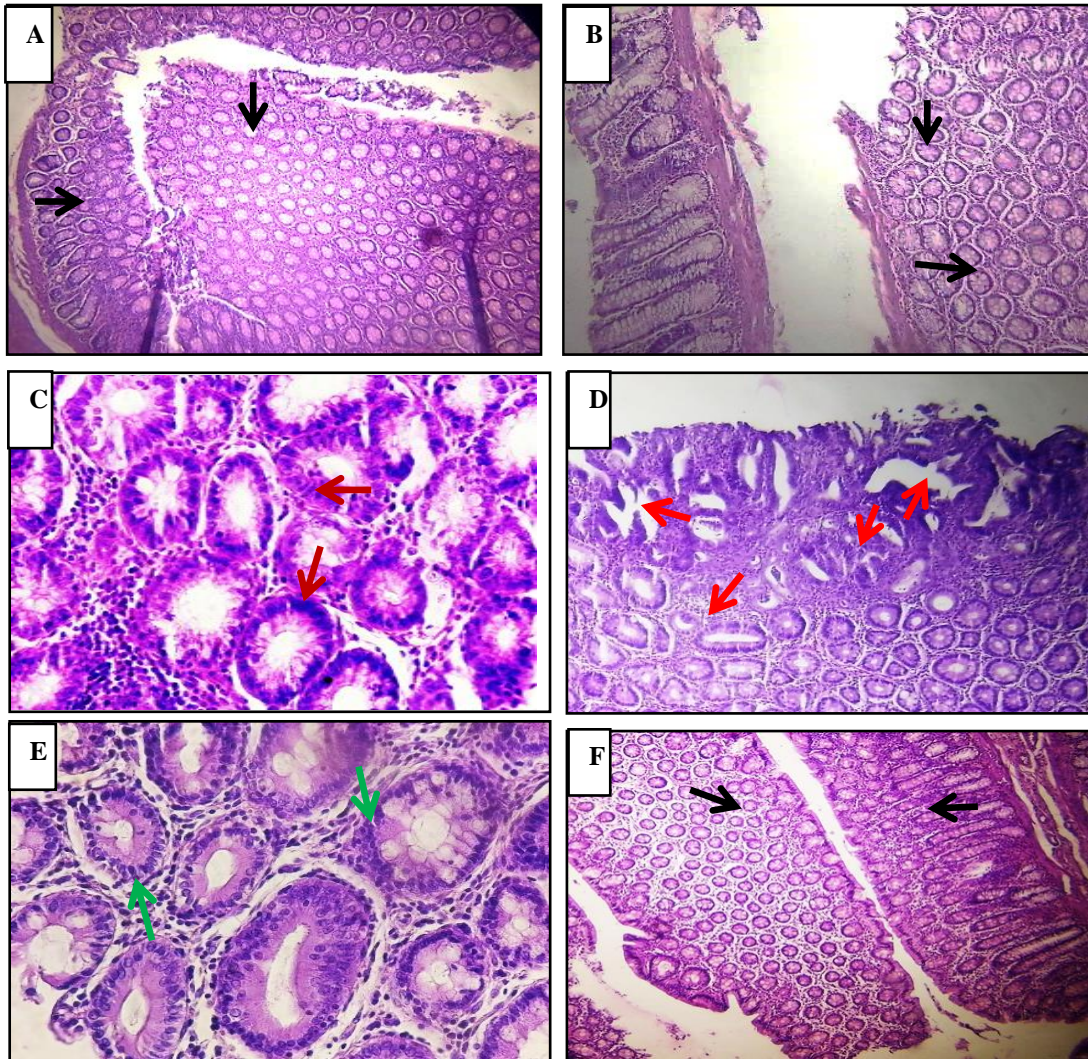


Figure 31: Observation microscopique des coupes histologiques des colons des rats après 16 semaines d'expérimentation (H & E).

Coupes histologiques des côlons des rats : (A) témoins négatifs non traités par DMH recevant le régime standard(G1),montrent des glandes normales (flèches noir) ; (B) témoins négatifs non traités par DMH soumis au régime régime hyper-gras (G2) (10×); (C) témoins positifs traités par DMH recevant le régime standard (G3), présence d'une dysplasie de haut grade (flèches grenat) (40×) ; (D) témoins positifs traités par DMH recevant le régime hyper-gras (G4) , présence d'un carcinome intra-muqueux (flèches rouge) (10×) ; (E) traités par DMH et nourris au régime hyper-gras supplémenté en 2.5% (p/p) de poudre d'écorce de grenade (G5), présence d'une dysplasie de bas grade (flèches vertes)(40×) ; (F) traités par DMH recevant le régime HG supplémenté en écorce et probiotiques (G6) (10×).

III.10. Effets in Vivo de la poudre d'écorce de grenade associée ou non à des souches bénéfiques sur le microbiote intestinal.

Afin d'évaluer l'impact de l'écorce de grenade et probiotiques sur la composition du microbiote intestinal. Nous avons isolé, identifié et dénombré, chez les six groupes expérimentaux, certaines bactéries à Gram négatif « *Escherichia coli*, *Bacteroides* sp. » et à Gram positif « *Lactobacillus* sp. *Bifidobacterium* sp. » et ceci au niveau fécale. L'identification au cours de ce protocole expérimentale a été basée sur l'appréciation des caractéristiques morphologiques et biochimiques.

III.10.1. Identification des bactéries recherchées

Les résultats de l'identification basée sur les tests morphologiques et biochimiques sont représentés dans le **tableau 9**. L'examen macroscopique sur le milieu Mac Conkey révèle des colonies roses entourées d'un halo opaque dû à la précipitation des sels biliaries, cependant, celui des bactéries cultivées sur milieu BBE modifié montrent des colonies grises cernées de zones de couleur marron à noire sous formes circulaires, pleines et convexes, avec un diamètre de 1 mm. D'autre part, l'observation macroscopique, effectuée sur le milieu MRS, a révélé l'apparition des colonies blanchâtres. Aussi, des colonies punctiformes, lissent, à bord régulier de coloration crème ont été observées sur le milieu MRS cystéiné.

L'observation microscopique des bactéries cultivées sur le milieu Mac Conkey nous laisse à percevoir une forme colibacille et elles révèlent une coloration Gram négative. Cependant, les bactéries isolées sur MRS ou MRS cystéiné sont des bactéries Gram positives.

Dès l'apparition des colonies sur le milieu de culture, les bactéries ont été soumises à des tests biochimiques réalisés soit à l'aide des galeries Api : Api 20E, pour *E. coli*, et Api 50CH, pour *Lactobacillus*, soit par des tests biochimiques : Catalase, oxydase, ONPG, ADH, ODC, LDC, urée indole, pour les autres bactéries isolées à savoir *Bifidobacterium* et *Bacteroides*.

Les résultats des tests biochimiques sur la galerie API 20E indiquent que la bactérie isolée possède les enzymes β -galactosidase, Lysine décarboxylase, Ornithine décarboxylase, mais elle dépourvue de l'Uréase, Tryptophane désaminase et Thiosulfate réductase (production de H₂S), ainsi cette espèce utilise le glucose et l'arabinose dans son métabolisme, par contre elle n'utilise pas le citrate comme unique source de carbone et d'énergie, également elle est capable de produire l'indole. L'ensemble de ces tests confirme des colonies bactériennes testées sont d'*E. coli*. Cependant, l'identification biochimique par le biais de la galerie Api

50CH pour les bactéries cultivées sur MRS révèle une espèce dominante de *Lactobacillus*, il s'agit de *Lactobacillus brevis*.

L'interprétation de ces résultats a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification "apiweb" (<http://apiweb.biomerieux.com>).

En outre, les résultats d'identification des bactéries isolées sur MRS cystéiné et BBE révèlent que ces dernières ne possèdent pas l'enzyme catalase, Lysine décarboxylase (LDC), et Ornithine décarboxylase (ODC) mais elles sont pourvus d'une uréase (**tableau 10**).

L'ensemble des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des bactéries isolées sur MRS et MRS cystéiné au cours de cette étude sont conformes aux caractéristiques d'identification des genres *Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp. décrites dans le manuel de Bergey de la bactériologie systématique (**Kandler et Weiss, 1986**) et Procaryotes (**Hammes et al., 1992**).

D'autre part, les résultats de l'identification des caractères morphologiques et biochimiques des bactéries isolées sur BBE modifié corroborent ceux indiqués par **Miyamoto et Ltoh (2000)** qui confirme le genre de *Bacteroides*.

Tableau 10 : Caractères macroscopiques, microscopique et biochimique des bactéries isolées de la matière fécale.

Tests	Mac Conkey	BBE modifié+ kanamycine	MRS	MRS+Cystéine HCl
Macroscopique	Colonies roses entourées d'un halo opaque	Colonies grises cernées de zones marron à noire	Colonies blanchâtres légèrement allongées.	Colonies punctiforme, de couleur crème.
Microscopique	Bacilles à Gram négatif	Bacilles à Gram négatif	Bacilles à Gram positif	Bâtonnets incurvés en V ou Y, à Gram positif
Catalase	+	-	-	-
Oxydase	-	NR	-	+
ADH	-	NR	NR	NR
Mannitol	+	-	+	-
Mobilité	-	-	-	-
Urée	-	+	+	+
Indole	+	-	-	-
ONPG	+	-	-	+
LDC	+	-	-	-
ODC	+	-	-	-

NR : Non réalisable, + : Test positif, - : Test négatif

III.10.2. Dénombrement d'*Escherichia coli* et des *Bacteroides* sp.

Les résultats de dénombrement de ces deux bactéries dans la matière fécale révèlent une réduction significative ($p < 0.001$) du nombre d'*E.coli* (58%) et de *Bacteroides* sp. (42%) chez les groupes de rat ayant reçu un régime hyper-gras incorporé d'écorce de grenade (G5) par rapport au groupe G4 (**fig.32**). Aussi, au cours de cette expérimentation une réduction de 60% et 58% du nombre d'*E. coli* et *Bacteroides* sp., respectivement a été constatée après l'administration de probiotiques aux rats de groupe G6 en comparaison avec le groupe G4.

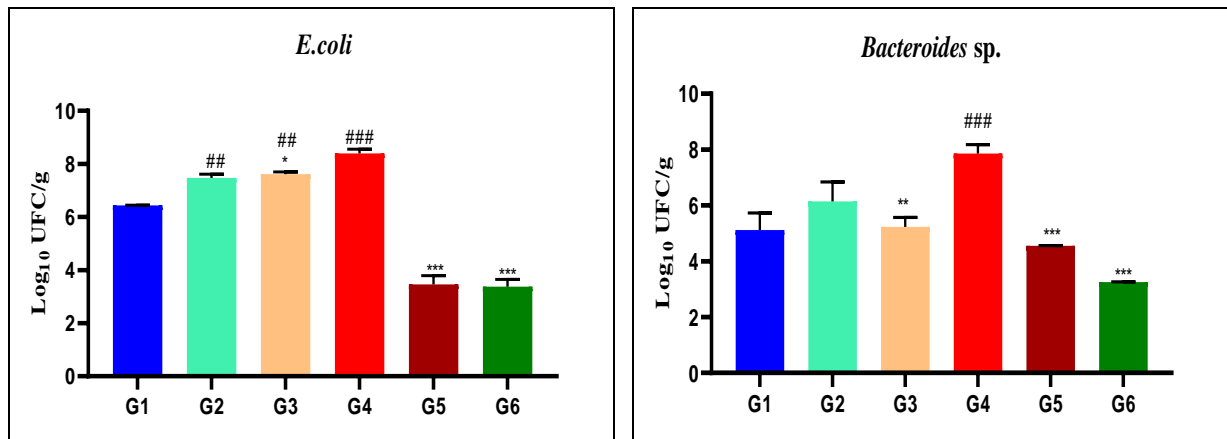


Figure 32 : Dénombrement de *Bacteroides* sp. et *E. coli* chez les rats durant les 16 semaines d'expérimentation.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ### $P < 0.001$ et ## $P < 0.01$ différence significative par rapport au témoin (G1), *** $P < 0.001$ et * $P < 0.05$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ;G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

III.10.3. Dénombrement des *Lactobacillus* sp. et des *Bifidobacterium* sp.

Les résultats de la numération de *Lactobacillus* sp.chez le groupe G5, indiquent une augmentation significative ($p < 0.001$) de la charge bactérienne en comparaison avec le groupe G4 (11.87 ± 0.25 vs 6.48 ± 0.05 log₁₀UFC/g). Aussi, le traitement par l'écorce de grenade induit une élévation significative ($p < 0.001$) du nombre de *Bifidobacterium* estimé à 52% chez le groupe G5 comparé au groupe G4.

En outre, la supplémentation des probiotiques chez les rats sous régime hyper-gras additionné d'écorce de grenade et traités par DMH (G6) provoque une augmentation des concentrations de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium*, cette augmentation est estimée à 92 et 117%, respectivement en comparaison au groupe témoin positif traité par DMH (G4) (fig.33).

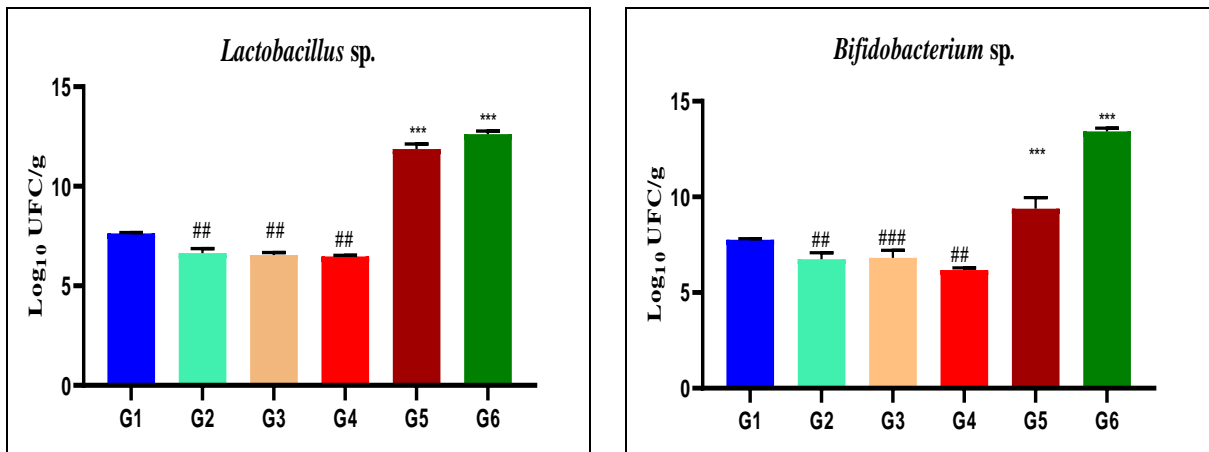


Figure 33 : Dénombrement de *Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp. chez les rats durant les 16 semaines d'expérimentation.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM avec $n=6$, ### $P<0.001$ et ## $P <0.01$ différence significative par rapport au témoin (G1), *** $P<0.001$ différence significative par rapport au groupe G4.

G1: non traité par DMH et sous régime SD ; G2: non traité par DMH et sous régime HG ; G3: traité par DMH et sous régime SD; G4: traité par DMH et sous régime HG ; G5: traité par régime HG et l'écorce de grenade ;G6: traité par régime HG et l'écorce de grenade+ probiotique.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Chapitre IV. Discussion

• Evaluation in Vitro de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits d'écorce de grenade

La grenade est largement utilisée depuis des milliers d'années en médecine traditionnelle, sa consommation a été associée à de nombreuses propriétés biologiques et thérapeutiques. Cependant, la consommation de ce fruit génère des quantités considérables d'écorce qui est souvent rejetée sans valorisation. Ce dernier peut être considéré comme une source naturelle très riche en molécules bioactives fortement utilisées dans le domaine médicales et alimentaires, de ce fait, diverses études se sont intéressées aux différentes méthodes et conditions d'extraction de ces molécules.

Cette première partie de l'étude s'intéresse dans un premier temps à évaluer l'effet du solvant d'extraction sur la composition et la teneur en composés phénoliques issus d'écorce de grenade (*Punica granatum L.*) et dans un deuxième temps à déterminer l'influence de ces solvants sur les propriétés antioxydantes et antibactériennes des extraits phénoliques obtenus.

Les résultats d'évaluation du rendement d'extraction, révèlent des taux approximativement similaires de ceux décrits par Shiban et *al.* (2012), ces derniers montrent un rendement d'extraction de l'ordre de 45%. D'autres études indiquent que l'extraction méthanolique présente un meilleur rendement évalué entre 31.5 et 48.2% (Li et *al.*, 2006 ; Zaki et *al.*, 2015). Ceci est confirmé par l'étude de Bassiri-Jahromi et *al.* (2015), ces derniers évoquent que le méthanol est le solvant le plus approprié dans l'extraction des composés phénoliques en raison de sa capacité à empêcher la réaction de la polyphénol-oxydase qui provoque l'oxydation des composés phénoliques et de son évaporation plus élevé par rapport à l'eau.

Les variations observées entre les rendements d'extraction dépendent du type de solvant. Il existe une affinité entre le solvant d'extraction et les composés d'extraits, ainsi que son activité biologique (Lee et *al.*, 2003 ; Ghasemzadeh et *al.*, 2011). Il est admis que les variations des rendements d'extraction pourrait être attribués non seulement à la différence de la polarité au solvant utilisé, qui joue un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques, mais aussi à la polarité des composés phénoliques qui constituent l'extrait (Felhi et *al.* , 2017).

L'analyse phytochimique dévoile des quantités similaires en polyphénols et en flavonoïdes pour les deux extraits EEEG et EMEG. En effet, le type du solvant d'extraction utilisé (méthanol ou éthanol) ne présente aucun effet sur la teneur en composés phénoliques.

Hadrich et al. (2014) ont réalisé une extraction des composés phénoliques à partir d'écorce de grenade en utilisant la technique de macération. Différents solvants ont été utilisés au cours de cette étude, parmi ces solvants le méthanol, l'éthanol et l'eau, ces auteurs rapportent que la teneur en composés phénoliques totaux des extraits obtenus après 24 h de macération, varie entre 0 et 290.1 ± 0.57 mg EAG/g de matière sèche. D'autre étude, confirme que les teneurs en composés phénoliques de l'extrait méthanolique issu de l'écorce sont de l'ordre de 274 mg EAG/g d'extrait et de 56.4 mg RE/g d'extrait pour les flavonoïdes (**Shiban et al., 2012**). De même, **Middha et al. (2013)** ont affirmé que la quantité en polyphénols de l'extrait méthanolique de l'écorce est de 298 ± 4.86 mg EAG /g MS et pour les flavonoïdes elle est de 49.8 ± 2.14 mg EQ /g MS. Aussi, **Hasnaoui et al. (2014)** ont rapporté des taux de l'ordre de 256.11 ± 0.73 et 251.61 ± 42.69 mg EAG /g de la quantité des composés phénoliques et ce pour deux cultivars de la variété Gabsi.

D'autres auteurs ont démontré, au cours de leurs travaux, que la teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique de 07 cultivars de grenade varie entre 295.5 mg /g extrait sec (Ganesh) et de 179.3 mg/g extrait sec (Molla de Elche) (**Fawole et al., 2012**).

Nos résultats sont en accord avec **Madrigal-Carballo et al. (2009)** qui ont étudié les caractéristiques physicochimiques de 19 cultivars de grenade, ces auteurs ont constaté que la quantité de polyphénols varie entre 354 et 783 mg /g MS.

Toutefois, dans une étude réalisée par Danial et Basudan, la concentration en composés phénoliques d'EEEG issu par macération est de l'ordre de 23 mg /g de matière sèche (**Danial et Basudan, 2019**). Cette valeur reste largement inférieure aux valeurs obtenues au cours de notre étude.

L'analyse phytochimique par HPLC des deux extraits d'écorce de grenade dévoile des profils de chromatogramme riche en compôsés phénoliques et approximativement identiques.

Plusieurs travaux ont confirmé la diversité et la richesse des extraits, issus d'écorce de grenade en composés phénoliques. Nos résultats corroborent ceux de **Middha et al. (2013)**. En effet ces derniers ont confirmé la présence d'acide gallique, punicalagine, rutine, quercetin et acide ellagique. **Shaban et al. (2013)** ont signalé la présence de l'acide gallique, chlorogénique, acide tannique, acide caféique et de la rutine. Une autre étude affirme la

présence de l'acide gallique, l'acide ellagique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, la quercétine et l'acide vanillique (**Mansour et al., 2013**). D'autres travaux, ont détecté la présence d'acide vanillique et de la quercétine (**Cai et al., 2004 ; Ahmed et al., 2017**). Alors que, **Gullon et al. (2016)** ont indiqué que les principaux composés bioactifs présents dans l'écorce de grenade sont la punicalagine et l'acide ellagique. On note l'existence d'autres composés non identifiés par manque de substances standards.

Il est clair qu'il existe des diversités entre les teneurs et le type des composés phénoliques et ceux évoqués par la littérature. Ceci peut être expliqué par le fait que le type de solvants, la méthode et la durée d'extraction peuvent influencer la quantité et la qualité des composés phénoliques et des flavonoïdes dans les différents extraits (**Grujic et al., 2012**). Cette disparité est également liée à l'altitude et la longitude des régions de culture (**Sheidai et al., 2012**).

Il est bien connu que les composés phénoliques et ses dérivés peuvent contribuer dans les activités biologiques de la plante et lui donné une valeur thérapeutique importante. Parmi ces activités les propriétés antioxydantes (**Pandey & Rizvi, 2009**), qui dépendent de leur capacité de réduire, de piéger les radicaux libre et / ou de chélater les métaux de transition (**Akhtar et al., 2015**).

Dans cette présente étude l'activité antioxydante a été déterminée par la méthode de FRAP. En effet, la capacité réductrice des extraits méthanolique et éthanolique issus d'écorce de grenade est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'extrait. Ceci s'explique par la contribution des antioxydants donneurs des électrons, présents dans les extraits de l'écorce.

La capacité réductrice élevée des extraits issus d'écorce de grenade pourrait être due à l'action de groupe hydroxyle des composés phénoliques pouvant agir comme donneurs d'électrons, ainsi qu'à leur profil chimique riche en flavonoïdes, en protocyanidines et en polyphénols totaux (**Singh et al., 2002**). Ces résultats corroborent ceux indiqués par **Derakhshani et al. (2018)**, qui dévoilent que l'écorce de grenade a un pouvoir antioxydant puissant en comparaison avec les autres constituants de la grenade. La forte activité antioxydante de l'extrait d'écorce de grenade peut être due à ses principaux polyphénols (**Middha et al., 2013**).

Une étude comparative menée par **Pal et al. (2017)** sur le pouvoir réducteur des extraits éthanoliques issus des écorces de grenade et d'orange, les résultats obtenus exhibent

une capacité réductrice de l'extrait phénolique de l'écorce de grenade six fois supérieur à celle de l'extrait issu de l'orange. Ce pouvoir réducteur élevé peut être dû aux ellagitannins, punicaline, punicalagine et de nombreux alcaloïdes pipéridiniques contenus dans les écorces de grenades (**Pal et al., 2017**). Dans le même sens, une investigation réalisée par **Hmid et al. (2017)** indique que les dix-huit cultivars de grenade d'origine Maroc sont très riches en polyphénols et que leurs propriétés antioxydantes et physico-chimiques sont influencées par le type de cultivar.

Aussi, **Belkacem** et ses collaborateurs en (**2014**) ont étudié le pouvoir réducteur des extraits d'écorce de grenade. D'après leurs résultats la fraction acétate d'éthyle de l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce possède une forte capacité réductrice en comparaison avec l'acide ascorbique avec une CE_{50} de l'ordre de 1.09 $\mu\text{g/mL}$.

Les résultats du pouvoir réducteur de nos extraits sont largement supérieurs à ceux rapportés par **Middha et al. (2013)**. Ces derniers indiquent que l'EMEG présente un pouvoir réducteur avec une concentration effectrice à 50% de l'ordre de 168 $\mu\text{g/mL}$.

En outre, plusieurs études montrent qu'il existe une corrélation entre l'activité antioxydante et le pouvoir réducteur des composés de certains extraits (**Huang & Prior et al. 2005 ; Middha et al., 2013**). Ces résultats suggèrent que l'écorce de grenade pourrait être une source potentielle de molécules bioactives et prometteuses dans la prévention des pathologies associées au stress oxydatif. Cependant, la variabilité du pouvoir antioxydant constatée entre les extraits testés peut être liée à la nature physico-chimique des molécules présents dans les extraits et à l'affinité du solvant pour certains groupes d'antioxydants (**Djeridane et al., 2007**). Selon **Cowan (1999)**, lors de l'extraction, les molécules bioactives sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité. Par conséquent, le changement de la nature du solvant modifie son efficacité pour extraire un groupe spécifique des antioxydants par rapport à d'autre groupe, ce qui influence l'activité antioxydantes des extraits (**Chernane et al., 2014**).

Les substances phytochimiques dérivées des plantes se sont avérées être une bonne solution alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la conservation des aliments. Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits issus d'écorce de grenade évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition et la détermination des valeurs de CMI révèlent que ces derniers exercent un effet inhibiteur sur la croissance de l'ensemble des souches testées.

Nous constatons que les souches de *S. aureus*, *B. subtilis* et *B. cereus* (Gram positif) sont les plus sensibles aux extraits en comparaison avec les souches de *E.coli* et *P. aeruginosa* (Gram négatif), ceci peut être expliqué par la différence de structure de la paroi entre les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives (Ali-Shtayeh et al., 1998). Ces données confirment celles obtenues par Malviya et al. (2014), ces auteurs rapportent que *S. aureus*, est sensible à l'EEEG et EMEG avec des diamètres de zones d'inhibition de 24 ± 0.53 mm et 20 ± 0.31 respectivement, contrairement à *E.coli* qui s'est montrée résistante à ces mêmes composés, ceci est évalué par un diamètre de zone d'inhibition de 7 mm (Naziri et al., 2012).

Negi et Jayaprakasha. (2003) ont également noté que l'extrait de l'écorce de grenade est moins efficace contre *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cette résistance de ces bactéries peut être attribuée à la nature de la paroi de ces souches.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Naziri et al. (2012), qui ont remarqué que l'EMEG exerce un effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries Gram positives par rapport à celles des bactéries à Gram négatif. De ce fait, la CMI de l'extrait de l'écorce de grenade déterminée par la méthode de dilution sur milieu liquide contre *E. coli* est de 31.3 mg/mL, et de 7.8 mg/mL vis-à-vis de *S. aureus*. Ceci confirme les résultats de Naz et al. (2007). Ces auteurs ont étudié, in Vitro, l'effet de différents extraits d'écorce de grenade sur six espèces bactériennes : *S. aureus*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi*. Ils ont montré que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée (Gullon et al., 2015).

Dans une autre étude réalisée par de Reddy et al. (2007), les extraits issus d'écorce de grenade présentent une activité antibactérienne contre *E.coli*, *P.aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *S.aureus*. Aussi, Al-Zoreky. (2009) a démontré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un inhibiteur puissant sur la croissance de *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*.

Choi et al. (2009) ont étudié l'effet inhibiteur, in Vivo et in Vitro, de diverses concentrations d'extraits d'écorce de grenade vis-à-vis de la croissance de Salmonella, ces derniers ont constaté que la dose minimale était de 62.5 mg/L.

Cette activité antimicrobienne des extraits est due, principalement, à sa composition phytochimique, et en particulier, à la nature de ses composés phénoliques majoritaires comme les tanins, en particulier la punicalagine et l'acide ellagique (Tehrani et al., 2011).

Elle peut être attribuée, aussi, à une ou plusieurs molécules, présente(s) en haute (s) proportion(s) dans l'extrait (**Mphahlele et al., 2016**).

De nombreux travaux ont démontré la corrélation entre l'activité antibactérienne et le profil chimique d'un extrait phénolique d'écorce de grenade. En effet, **Prashanth et al. (2001)** ont démontré que différents composés phénoliques extraits à partir d'écorce de grenade sont obtenus en fonction du solvant utilisé. De ce fait, l'extrait méthanolique semble posséder une activité antibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *S. aureus*, *P. vulgaris* et *B. subtilis* (**Reddy et al., 2007**).

Dans une investigation réalisée par **Nozuhour. (2018)** ont démontré que les extraits aqueux, éthanoliques et butanoliques de grenade ont des activités antibactériennes contre *E.coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* résistant à la méthicilline.

Ce résultat va de pair avec celui obtenu par **Duman et al. (2009)**, ces derniers rapportent que les valeurs de CMI pour les extraits de grenade contre *S.aureus* et *P. aeruginosa* varient entre 40 et 90 µg/mL. Ainsi, il est possible de supposer que l'effet antibactérien de l'écorce de grenade peut être attribué à l'action combinée de divers composés bioactifs en suivant divers mécanismes d'action.

Les mécanismes d'inhibition des composés polyphénoliques, y compris les polyphénols hydrolysables (tannins) constituant les principaux composants de l'écorce de grenade, sont associés à la précipitation des protéines membranaires des bactéries entraînant une lyse cellulaire (**Akhtar et al., 2015**).

De même, **Cowan (1999)** a démontré que les polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur les composés phénoliques. Cette toxicité peut être liée à l'inhibition des enzymes hydrolytiques telles que les protéases et les carbohydrolases ou d'autres interactions inactivant les adhésines microbiennes, les protéines de transport et de la paroi cellulaire.

D'autre part, **Dominico et al. (2005)** suggèrent que l'effet antimicrobien des composés phénoliques est dû partiellement à des perturbations des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, ce qui provoque une altération de la perméabilité de la membrane et une perturbation de son intégrité et en conséquence la perte de ses organites intracellulaires, la caractéristique physicochimique de ces composés est fortement impliquée dans ce mécanisme.

- **Impact de l'écorce de grenade (*Punica granatum L.*) combinée ou non à des souches bénéfiques sur les lésions précancéreuses chimio-induites.**

Le cancer du côlon est une affection occupant une place majeure dans les problèmes de santé publique. Il est largement démontré qu'une alimentation riche en composés bioactifs naturels et en fibre alimentaire est impliqué dans la réduction de risque du cancer du côlon (Cohen et al., 2014). Pour cette raison, les composants ayant des activités antioxydante et anticancéreuse ont reçu beaucoup d'attention par les chercheurs scientifiques.

Les effets bénéfiques de *Punica granatum L.* ont un intérêt considérable de par sa richesse en molécules bioactives capables de prévenir l'installation des cancers (Basu & Penugonda, 2009).

Dans ce contexte, cette partie d'étude s'intéresse à l'évaluation de l'effet protecteur de l'écorce de grenade associée ou non à des souches probiotiques vis-à-vis des désordres métaboliques et oxydatifs associés aux lésions précancéreuses coliques.

Après 16 semaines d'expérimentation les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation significative du poids corporel, de la masse du tissu adipeux et le nombre de calories ingérées et ce chez les rats nourris avec le régime hyperlipidique par rapport aux rats recevant le régime standard. Ceci va de pair avec plusieurs études suggérant que l'augmentation des apports énergétiques alimentaires et plus particulièrement lipidiques entraînent le développement d'un surpoids conduisant à une obésité associée à des désordres métaboliques (Cani et al., 2008). Aussi, nos résultats corroborent ceux indiqués par Golay et al. (1998) qui révèlent qu'un régime hyperlipidique et ou hypercalorique est lié à une accumulation de tissu adipeux et une surcharge pondérale pouvant aller jusqu'à l'obésité chez l'homme et chez l'animal.

Une étude affirme que l'alimentation des rats par un régime hyperlipidique (40% apport énergétique) développe une obésité due à une augmentation de la prise calorique (Woods et al., 2003), Ainsi des souris soumis à un régime alimentaire contenant 45% apport énergétique (kcal) sous forme de lipide induit une obésité. Les études de Park et al., (2007) et Marques et al., (2015) confirment que le traitement des rats Wistar par un régime hyper-gras est suffisant pour induire un important gain de poids. L'ensemble de ces données va de pair avec nos résultats qui révèlent que le régime hyper-gras élaboré à 48% de lipides induit une augmentation de la masse corporelle et le gain de poids en comparaison avec le groupe des rats sous le régime standard.

Le développement de surpoids en réponse à l'alimentation par le régime hyperlipidique pourrait être expliqué par la capacité de lipide à induire un équilibre énergétique positif qui se traduit par une augmentation du dépôt de graisse viscérale. De plus, l'alimentation par ce régime serait accompagnée d'adaptations moléculaires qui favorisent le stockage des graisses dans les muscles plutôt que l'oxydation (**Schrauwen-Hinderling et al., 2005**).

D'autre part, une autre étude confirme que les souris nourries avec un régime riche en graisses sont plus sensibles à l'induction de tumeur du côlon par l'AOM (**Chen & Huang, 2015**). Cette association peut être expliquée par l'augmentation de la production des acides biliaires secondaires par les bactéries qui composent le microbiote intestinal, ce qui provoque par la suite la production des effecteurs pro-inflammatoires induisant un déséquilibre oxydatif et favorisant ainsi le développement du CCR (**Reuter et al., 2010**).

Au cours de notre étude nous avons constaté que le traitement par le DMH seul ou associé au régime alimentaire (hyper-gras ou standard) n'induit aucune différence significative sur l'évolution des poids corporels chez les différents groupes expérimentaux. Ceci corrobore les travaux de **Park et al. (2007)** et **Waly et al. (2012)**. Ces chercheurs ont démontré que le DMH n'a aucune influence sur la masse corporelle des rats.

Cependant, la supplémentation en écorce de grenade combinée ou non aux probiotiques induit une diminution de la prise de poids provoquée par le régime hyper-gras en comparaison aux groupes de rats traités par le DMH et étant nourris au même régime. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés par **Hossin. (2009)** qui démontrent que la poudre de l'écorce de grenade supplémentée en régime hyper-gras a diminué le gain de poids et la prise alimentaire. Ceci peut être expliqué par l'effet inhibiteur de l'extrait d'écorce de grenade sur la différenciation préadipocytaire et l'adipogenèse (**Sorrenti et al., 2019**).

De la même manière, l'étude entreprise par **Puccio et al. (2007)** indique qu'une administration d'un mélange synbiotique composé d'inuline et de bactéries bénéfiques (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* et *Streptococcus thermophilus*) pendant 5 semaines a réduit le poids corporel des rats. Parallèlement, dans une étude réalisée sur des rats nourris avec une diète riche en lipide, la supplémentation d'un mixte de bactéries probiotiques constitué de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* et *S. thermophilus* entraîne une diminution de la masse graisseuse et hépatique sans qu'il y ait eu réduction de la prise alimentaire et changement dans le gain de poids corporel des rats (**Fava et al., 2013**).

Au cours de la durée d'expérimentation, le traitement par l'écorce de grenade seul ou en association à des souches bénéfiques chez des rats traités par le DMH provoque une réduction dans le taux des paramètres biochimiques plasmatiques. Ceci a été constaté aussi par **Hossin. (2009)**. Qui a confirmé que l'écorce de grenade améliore le profil lipidique plasmatique, en réduisant de manière significative le taux des triglycérides, abaisse sensiblement le cholestérol total, et le C-LDL chez des rats traités par un régime hyper-gras. Cette amélioration due au traitement d'écorce seul ou combinée aux probiotiques, a été également observé par d'autres chercheurs, ces derniers affirment une réduction de la teneur en triglycérides, et de l'accumulation des lipides intracellulaires in Vitro (**Sorrenti et al. 2019**).

D'autre part, **Ramzy (2019)**, a décrit un effet hypocholestérolémiant et hypotriglycédirimant de la poudre d'écorce de grenade dans une étude réalisée sur des rats Wistar. Cette diminution peut être expliquée par l'effet bénéfique des composés bioactifs de l'écorce de grenade, les polyphénols et les fibres alimentaires. En effet, plusieurs études démontrent que l'écorce de grenade est une source très riche en molécules bioactives (polyphénols et flavonoïdes), qui exercent un effet protecteur sur le profil lipidique.

Les polyphénols pourraient modifier le nombre et le type des bactéries constituant la microflore intestinale. Celle-ci utilise, ces molécules bioactives pour produire différents métabolites secondaires tels que l'acide dihydroxyphényle, l'acide phénylpropionique, et l'urolithine A (**Cortes-Martin et al., 2018 ; Rowland et al., 2018**), ces derniers sont aisément absorbables par l'intestin et ont des activités antioxydante et anti-inflammatoire supérieure aux polyphénols générés (**Ito, 2011**). Ces dérivés secondaires sont capables d'influencer le métabolisme des lipides en favorisant leur excrétion dans les selles et en diminuant ainsi le taux du cholestérol plasmatique chez les rats hypercholestérolémiques (**Selma et al., 2018**).

D'autre part, **Ziar et al. (2014)** ont rapporté que les souches bénéfiques, comme les bactéries lactiques sont capables d'assimiler le cholestérol in Vitro. Aussi, les travaux d'**El Shafie et al. (2009)** ont illustré que l'administration des probiotiques abaisse sensiblement les teneurs plasmatiques en cholestérol chez des rats soumis à un régime hyperlipidique. De même **Taranto et al. (1998)** ont montré que l'administration journalière de *Lactobacillus reuteri* (10^4 UFC par souris) diminue de 40 % la teneur totale en cholestérol chez des souris hypercholestérolémiques. En effet, les mécanismes proposés pour expliquer cette diminution, impliquerait l'assimilation du cholestérol par les bactéries probiotiques (**Ziar et al., 2014; Tomaro-Duchesneau et al., 2014**), l'hydrolyse des sels biliaires conjugués ,et enfin la

production de composés, tels que l'acide ferulique (**Tomaro-Duchesneau et al., 2012**) qui peuvent inhiber l'activité des enzymes, y compris l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase hépatique et favoriser l'excrétion de stérol (**Kim et al., 2003**).

Nous constatons aussi de ces résultats une augmentation des taux des transaminases plasmatiques chez les rats sous régime hyper-gras et traités par DMH. Ce dernier est bioactivé au niveau hépatique par les enzymes dépendantes des cytochromes P450 pour donner un métabolite actif : l'AOM. Cette activation peut induire des lésions hépatiques est causer un relargage des transaminases au niveau sérique. Ces résultats vont de pair avec ceux de **Shebbo et al., (2020)**. Ils démontrent qu'une hépatotoxicité induite par le DMH est caractérisée par une élévation des taux d'ALAT et ASAT sériques, celle-ci est attribuée aux lésions hépatiques induites par le DMH lors de son activation par les cytochromes P450..

Cependant, nous constatons que ces taux diminuent lors du traitement simultané : écorce et probiotiques. Ces résultats ont été observés par **Sadeghi** et son équipe (**2014**), ils dévoilent que le traitement par un extrait éthanolique issu d'écorce de grenade prévient les lésions hépatiques et maintient les taux plasmatiques en ASAT et ALAT, des rats Wistar soumis à un régime lipidique, constant.

Les résultats de dosage des paramètres oxydatifs vont de pair avec ceux indiqués par **Perse & Cerar. (2011)**. Ces derniers confirment que le régime hyperlipidique chez des rats traités par DMH réduit le potentiel de défense antioxydant total plasmatique et tissulaire ce qui entraîne une modification du statut oxydatif. En effet, une étude affirme que le cancer du côlon chimio-induit chez des modèles expérimentaux provoque non seulement la production excessive des radicaux libres, mais aussi la diminution des capacités de défense antioxydantes par la baisse de l'activité de certaines enzymes antioxydantes (**Hamiza et al., 2012**).

Cette perturbation de la balance pro-oxydant/antioxydant est en relation avec le métabolite secondaire issu de DMH au niveau hépatique par les enzymes de la bioactivation, etau niveau colique par le biais de la microflore intestinale. La déconjugaison de l'AOM, un métabolite secondaire de DMH par des enzymes bactériennes fécales, telles que la β -glucuronidase, provoque le relargage du méthylazoxyméthanol, celui-ci est alors transformé dans les cellules coliques en dérivé extrêmement cancérogène, à savoir : le méthyldiazonium (**Mario et al., 2014**). Ce composé pro-oxydant induit un stress oxydatif provoquant une diminution du pouvoir antioxydant total plasmatique ainsi que des dommages macromoléculaires essentiellement via la méthylation de l'ADN (**Thangaraj et al., 2018**).

Aussi, le DMH aboutit à la peroxydation des lipides au niveau plasmatique et au niveau érythrocytaire (**Bobek et al., 2000**).

Cette peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques ou d'autres éléments contenant des lipides (**Al-Mutairi et al. 2007**). Ce qui entraîne une perte de l'intégrité et la perméabilité membranaire et en conséquence une inactivation des récepteurs et des transporteurs membranaires. Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à une transformation cellulaire (**Park et al ., 2007**).

Au cours de cette étude, l'évaluation du pouvoir réducteur total dévoile que celui-ci est amélioré chez les rats ayant ingérés le régime hyper-gras supplémenté en écorces de grenade seules ou en association avec les probiotiques comparé aux rats étant nourris au régime riche en graisse et traités par le DMH.

Ces résultats confirment ceux obtenus par **Sharma et al. (2017)**, ces chercheurs ont mis en évidence le rôle de polyphénols de l'écorce de grenade dans la neutralisation du stress oxydatif développé au cours du cancer du côlon. Plusieurs études indiquent que les polyphénols de grenade peuvent exercer leur activité antioxydante par le biais de la chélation des métaux de transitions (**Chidambara et al., 2002 ; Kulkarni et al., 2007**), ces polyphénols forment avec le cuivre un complexe cuivre-polyphénol (**Azmi et al., 2013**). La punicalagine, le polyphénol de grenade quantitativement le plus important, lie entre autre le cuivre et le fer, sans se lier à l'ADN (**Kulkarni et al., 2007**).

Nous constatons aussi que ce traitement induit une protection contre l'oxydation des groupements thiols et de la peroxydation lipidique. Ceci a été confirmé par **Salwe et ses collaborateurs. (2015)**, qui suggèrent que les polyphénols de l'écorce de grenade, tels que l'acide ellagique et punicalagine, induisaient une réduction des lésions oxydatives lipidiques, évaluée par la mesure des substances réactives de l'acide Thiobarbiturique. Ce résultat nous laisse suggérer que l'incorporation de l'écorce restaure le statut oxydatif des rats sous régime hyper-gras et DMH.

Désormais, il est bien établi qu'il existe un lien étroit entre l'état inflammatoire et le stress oxydatif au cours du développement du cancer du côlon (**Reuter et al ., 2010**). Ce qui pourrait expliquer l'effet antioxydant des polyphénols de l'écorce de grenade, via leur activité anti-inflammatoire. Cette activité est aussi impliquée dans l'effet inhibiteur des polyphénols contre le développement du cancer du côlon. Cette inhibition peut être expliquée par une action double, une action liée au potentiel des polyphénols à influencer directement

l'expression des facteurs pro-inflammatoires tels que les COX-2, NF- κ B et TNF α et leur effet anti-tumoral. Larossa et al (2006) ont révélé que l'acide ellagique de l'extrait de grenade possède un effet antiprolifératif qui se traduit par l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et l'induction de l'apoptose.

Une autre étude menée par Kasimsetty et al., (2010) confirme et complète ces données en rapportant que les polyphénols de grenade et leurs métabolites, à savoir, urolithins A et C, inhibent la prolifération des cellules cancéreuses HT-29 en induisant ainsi la voie apoptotique. Cette inhibition est principalement montrée par un blocage en phase S, confirmé par la suppression de Kinase Dépendante Cycline (Cdk A et B1), nécessaire à la progression cellulaire vers la phase G2 / M.

Sharma et al. (2010) a montré que les polyphénols, du fruit de grenadier, et leurs métabolites inhibent la voie de signalisation de Wnt gène impliqué dans le développement du cancer du côlon. Aussi, dans un modèle expérimental animal traité par DMH, un régime contenant 3% (p/p) d'extrait de grenade inhibe la surexpression des gènes Wnt et diminue la formation des tumeurs (Sadik & Shaker, 2013).

Parallèlement, les résultats obtenus au cours de cette étude indiquent que le mixte de probiotiques et écorce de grenade incorporé au régime hyper-gras a une capacité d'améliorer le statut oxydant essentiellement la peroxydation lipidique. Ces résultats corroborent avec les travaux de Qadir et al. (2013). Ces derniers ont dévoilé que l'administration des probiotiques entraîne une diminution des MDA chez des rats soumis à un traitement combiné HG /DMH, cette diminution peut être due au mécanisme qui provoque la destruction des radicaux libres non oxygénés.

Ainsi, ces probiotiques ont un effet antioxydant très important qui peut avoir un rôle protecteur contre le cancer du côlon. En effet, il a été rapporté que les bactéries bénéfiques, ou leurs métabolites peuvent exercer un effet antioxydant, mis en évidence par un effet protecteur contre l'hémolyse, dû aux radicaux libres, chez des rats déficient en vitamine E (Kaizu et al., 1993).

Ito et al. (2003) ont rapporté que l'ingestion d'un régime alimentaire contenant *Streptococcus thermophilus* YIT 2001 (2×10^8 UFC/j) pendant 2 semaines de traitement induit, une réduction significative des lipides peroxydés (TBARS) dans la muqueuse colique des souris exposées au stress. Une étude menée sur un modèle expérimental animal a permis de suggérer la capacité des bactéries probiotiques à réduire le niveau de MDA. Au cours de cette

étude les auteurs ont observé que le produit probiotique contenant *L. acidophilus* NCDC14 et *L. casei* NCDC19 diminuait les dommages oxydatifs en inhibant la peroxydation lipidique générés par le streptozotocine (un inducteur de diabète) dans les tissus pancréatiques (**Yadav et al., 2008**). Récemment, l'effet protecteur des probiotiques vis-à-vis de la peroxydation lipidique a été largement confirmé (**Zamani et al., 2019**).

En outre, les probiotiques peuvent également stimuler le système antioxydant de l'hôte en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes. **Wang et al., (2009)** ont montré que la supplémentation alimentaire en *Lactobacillus fermentum* pourrait augmenter la SOD, GPx sériques, améliorer la catalase hépatique et la SOD musculaire par rapport au groupe témoin. De même, **Walia** et ses collaborateurs (**2018**), ont rapporté que l'administration de *L. rhamnosus* GG chez des rats traités par le DMH a considérablement augmenté l'activité des enzymes antioxydantes, ces enzymes sont impliquées dans la protection cellulaire contre les ERO (**Wang et al., 2017**) donc leur augmentation sera corrélée à celle des ERO .

Les mécanismes impliqués dans l'activité antioxydante des probiotiques est probablement due à : la chélation des ions métalliques ; en particulier le fer et le cuivre ; et la possession de leur propre défense antioxydante enzymatique et non enzymatique, impliquée dans régulation des voies de signalisation produisant les ERO et la modulation du microbiote intestinal (**Wang et al., 2017**). Ainsi, les probiotiques peuvent réduire les dommages à l'ADN, inhiber l'inflammation, jouer un rôle dans la protection et le traitement du cancer (**Eslami et al., 2019**).

L'effet bénéfique combiné du probiotique et prébiotique sur le stress oxydatif associé au cancer du côlon a été confirmé par plusieurs études. En effet, **Kleniewska & Pawliczak. (2017)** ont affirmé que la synergie de *L. casei* et inuline abaissent significativement le marqueur de peroxydation lipidique (MDA) et augmente les concentrations de glutathion réduit et protège les groupements thiols.

Au cours de notre expérimentation, le mixte de bactéries probiotiques et écorce de grenade incorporé au régime hyper-gras, chez des rats traités par DMH, restaure l'aspect histologique normale du colon, qui se traduit par l'absence de tumeur et à la disparition des signes de dysplasie dans les cryptes coliques. Ce résultat est en accord avec ceux affirmés par **Waly et al. (2012)** ; **Ahmed et al. (2017)**, ces chercheurs évoquent que le traitement par l'extrait d'écorce de grenade empêche le développement des lésions précancéreuses coliques chez un modèle de cancérogénèse chimio-induite. La prévention contre le développement de

la carcinogénèse colique par l'écorce de grenade peut être expliquée par son pouvoir proapoptotique. Dernièrement, une étude expérimentale a démontré que l'extrait de l'écorce de grenade induit l'apoptose, réduit l'inflammation et inhibe la prolifération des cellules tumorales (**Ahmed et al., 2017**).

De plus, plusieurs données ont mis en évidence un effet protecteur de probiotique sur le développement du cancer colorectal. En effet, une étude menée par **De Moreno et al. (2004)** ont exhibé que l'administration de yaourt à des souris traitées par DMH inhibe la promotion et la progression tumorales par modulation de la réponse immunitaire et la stimulation de l'apoptose. En effet, il a été largement démontré que les probiotiques affectent les réponses immunitaires et cellulaires par plusieurs mécanismes faisant intervenir le renforcement de la barrière épithéliale, la stimulation de la production des composés anti-inflammatoire, antioxydant et anti-carcinogène (**Chang et al., 2012; Toral et al., 2014**).

Certaines bactéries probiotiques telles que *Lactobacilles* peuvent exercer un effet immunomodulateur par le biais de l'induction de l'activité régulatrice des lymphocytes T, la stimulation de l'activité phagocytose bactéricides des neutrophiles et l'activité cellulaire de *natural killer* (NK) impliquée dans la suppression de la tumorigénèse. **Urbanska** et ses collaborateurs (**2009**) ont démontré que la propriété immunomodulatrice potentiel de probiotique *L. acidophilus* est corrélée à la réduction des tumeurs intestinales, la dysplasie et l'inflammation. Le mécanisme impliqué est lié au dysfonctionnement de l'activité de la protéine kinase régulée par les signaux extracellulaire.

Probiotique Lactibiane tolérance®, utilisé au cours de cette étude, a déjà prouvé son caractère immunomodulateur et évalué in Vitro via la quantification des cytokines Interleukine (IL-10, IL-12) et Interféron (IFN- γ) après incubation pendant 24h avec des cellules mononuclées sanguines humaines. Les souches présentes dans ce produit, et plus particulièrement *L. salivarius* LA 302, sont capables d'induire la production d'IL-10 par les cellules mononuclées sanguines. L'IL-10 est considérée comme une cytokine présentant des propriétés régulatrices vis-à-vis des lymphocytes T auxiliaires, Th1 et Th2 (**Drouault-Holowacz et al., 2006**). En effet, ces propriétés immunomodulatrices in Vitro semblent très bien corrélées à leur capacité anti-inflammatoire in Vivo (**Foligné et al., 2006**).

La dysbiose du microbiote intestinal est fortement impliquée dans la genèse du cancer colique. Les probiotiques et ou prébiotiques pourraient être des bon modulateurs du microbiote dont la variation de la composition et la nature sont largement impliquées dans la

cancérogénèse colique (**Boutron-Ruault, 2007**). Au cours de notre étude, la supplémentation par les probiotiques seuls ou en association avec l'écorce de grenade influence le profil de la microflore intestinale des rats traités par le régime hyper-gras et DMH ceci est reflétée par la diminution du nombre des bactéries pathogènes *E. coli* et *Bacteroides* chez ces groupes. Cette réduction se traduit par l'effet bénéfique des composés bioactifs de l'écorce de grenade qui sont les polyphénols et les fibres alimentaires.

Il est clairement établi que les polyphénols pourraient aussi et de manière avantageuse modifier la composition du microbiote en le restaurant, et ce via son effet antibactérien et prébiotique (**Neyrink et al., 2013**). Cet effet, largement décrit dans la littérature, contribue fortement au processus anti-cancéreux (**Waly et al., 2012 ; Chen et al., 2018**). En 2007 **Reddy** et ses collaborateurs, ont démontré que la punicalagine de l'écorce de grenade exerce une activité antimicrobienne en inhibant la croissance de nombreuses bactéries pathogènes, essentiellement *E. coli*, certaine souche ayant le pouvoir de produire la toxine de colibactine. Celle-ci est caractérisée par un potentiel clastogène, elle induit des cassures des doubles brins d'ADN dans les cellules intestinales, déclenchant ainsi une instabilité chromosomique ceci peut conduire vers une transformation des cellules saines en cellules cancéreuses (**Cuevas-Ramos et al., 2010**).

Une étude évoque que les polyphénols (éllagitannins) de la grenade inhibent la croissance des bactéries *Bacteroide fragilis*, d'une manière dose-réponse (**Bialonska et al., 2009**). Cette activité antimicrobienne peut s'expliquée par une diminution du pH de la lumière intestinale par les polyphénols qui affecte de manière significative le profil intestinal. Parallèlement, d'autres études montrent qu'une forte consommation de fibres alimentaires, provoque une forte production des AGCC, qui peuvent abaisser le pH intestinal qui empêche la croissance des bactéries potentiellement pathogènes comme *E. coli* et d'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (**Keddari et al., 2014**).

Aussi, les résultats de cette étude dévoilent que l'écorce de grenade en poudre augmente significativement le nombre des *Lactobacillus* sp. au niveau fécal chez des rats traités par DMH et soumis au régime hyper-gras. Ces résultats sont conformes aux ceux obtenus par **Dolara** et ses collaborateurs en (2005). Cette augmentation peut être expliquée par l'association de deux traitements : premièrement l'écorce de grenade qui stimule sélectivement, par le biais de l'activité prébiotique (**Neyrink et al., 2013**) *Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp. et secondairement par l'administration des bactéries bénéfiques à caractère probiotique.

Li et ses collaborateurs. (2015), suggèrent que la grenade peut potentiellement se comporter comme un prébiotique, grâce à ses flavonoïdes qui induisent une augmentation de la croissance de *Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp. , deux bactéries ayant un fort potentiel probiotiques et inhibent simultanément la croissance de *Bacteroides fragilis*, Clostridia et *Enterobacteriaceae*. Une étude chez la souris a exhibé que l'administration orale de l'extrait d'écorce de grenade exerce un effet prébiotique par la modulation du microbiote intestinal en augmentant le nombre de Bifidobactéries (**Neyrink et al., 2013**).

Par ailleurs, le traitement des souris par un régime riche en graisse supplémenté en extrait commercial de sous-produit de grenade réduit le nombre du genre de *Bacteroides* (**Zhang et al., 2017**).

Ainsi, **Ali et al. (2019)** ont constaté que l'administration combinée de *L. casei* et inuline (prébiotique) a présenté un effet protecteur contre un cancer du côlon induit par DMH chez des souris, grâce à l'enrichissement du microbiote par des bactéries bénéfiques telles que : *Akkermansia* et *Turicibacter*.

Il a été démontré également qu'une bactérie probiotique, essentiellement *Lactobacillus salivarius*, présente des propriétés antiprolifératives en s'adhérant directement aux cellules cancéreuses coliques ce qui provoque un déclenchement de la production de l'acide butyrique et d'autres acides gras à chaîne courte (**Thirabunyanon & Hongwittayakorn, 2013**).

Selon **Rafter. (2002)** certaines bactéries probiotiques pouvaient réduire l'activité des enzymes pro-cancérogènes et la concentration des mutagènes ou des acides biliaires secondaires dans les selles ce qui inhibent la croissance de certaines souches capables de transformer les facteurs pro-cancérogènes en facteurs cancérogènes.

Le Blanc (2005) affirme le rôle des ferments lactiques de yaourt dans la réduction des enzymes pro-cancérogènes telles que la β -glucuronidase, une enzyme responsable à l'hydrolyse de glucuronides dans l'intestin. Cette réaction engendre des substances toxiques et cancérigènes qui sont détoxifiés par la formation de glucuronidase dans le foie, puis entrer dans l'intestin par la bile. Ainsi, les aglycones toxiques peuvent être régénérés dans l'intestin par la β -glucuronidase.

Une autre bénéfice de cette souche est de réduire l'inflammation de la muqueuse et la cancérogénèse colique, chez les souris en modulant la microflore intestinale (**O'Mahony et al., 2001**). En outre, **Kahouli** et ses collaborateurs (2017), ont clairement exhibé que l'administration orale journalière de *Lactobacillus acidophilus* micro-encapsulé à de

concentration (10^9 à 10^{11} UFC/mL) a réduit la taille de tumeur, la multiplicité et la progression du cancer dans le modèle de souris.

CONCLUSION

Conclusion

Le cancer du côlon est une affection occupant une place majeure dans les problèmes de santé publique, car il représente le type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les deux sexes confondus. Actuellement, plusieurs études évoquent que les molécules bioactives ainsi que les probiotiques, pourraient constituer des facteurs nutritionnels prometteurs, dans les stratégies préventives qui visent à restaurer la dysbiose intestinale et les pathologies qui lui sont associées. Parmi ces facteurs les fibres, les polyphénols de l'écorce de grenade ainsi que les bactéries bénéfiques sont des candidats à prendre en considération dans ce genre de stratégie.

Dans cette optique, ce présent travail s'intéresse à l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'écorce de grenade d'une part et d'autre part d'étudier l'effet préventif de ce fruit en association avec un mélange de probiotiques vis-à-vis des altérations qualitative et quantitative du microbiote intestinal, et du stress oxydatif associés aux lésions précancéreuses coliques.

Les résultats obtenus indiquent que l'analyse phytochimique des composés phénoliques et des flavonoïdes des extraits d'écorce de grenade dévoilent des quantités similaires en terme de polyphénols et de flavonoïdes et ce pour les deux extraits méthanolique et éthanolique. Cependant, l'extrait éthanolique présente un fort pouvoir réducteur de fer plus élevé en comparaison à celui obtenu par l'extrait méthanolique. Parallèlement, les deux extraits d'écorce de grenade exercent un effet antibactérien important vis-à-vis des souches bactériennes testées avec une CMI de l'ordre de 3.9 et 15.62 mg/mL et CMB entre 7.81 et 250 mg/mL.

Par ailleurs, les résultats de l'étude in Vivo montrent que l'administration de l'écorce de grenade seule ou en association avec les probiotiques provoque une variation du profil lipidique et en transaminases qui se traduit par une diminution significative des teneurs plasmatiques en cholestérol total, C-LDL, Triglycérides, ASAT et ALAT chez les rats de groupes G5 et G6 comparativement aux rats du groupe témoin positif traité par DMH (G4).

Cependant, le traitement par l'écorce de grenade combinée ou non aux probiotiques exerce un effet antioxydant en augmentant significativement le pouvoir réducteur plasmatique et tissulaire. Cette variation est marquée par une augmentation chez les groupes G5 et G6 par rapport au groupe témoin G4. Ainsi, il influence les groupements thiols (SH) en provoquant une augmentation significative estimée à 67 et 75% au niveau plasmatique chez

les groupes sous régime hyper-gras supplémenté ou non aux probiotiques (G5 et G6) par rapport au groupe G4.

En outre, ce traitement provoque une réduction significative des lésions oxydatives lipidiques au niveau plasmatique estimé à 55% et 66% chez les groupes G5 et G6, respectivement en comparaison avec le groupe témoin G4. Il améliore aussi l'architecture histologique du colon lésé et ce en comparaison avec le groupe témoin positif traité par DMH (G4).

D'autre part, les résultats de l'analyse microbiologique de microbiote intestinal démontrent que le régime hyper-gras supplémenté en écorce de grenade, combinée ou non aux probiotiques induit une diminution des bactéries pathogènes incriminées dans la dysbiose associée aux lésions précancéreuses. En effet, le dénombrement d'*E.coli* et de *Bactéroïdes* sp. dans la matière fécale indique une réduction chez les rats soumis au régime hyper-gras incorporé d'écorce de grenade et probiotiques (G5 et G6) et ce en comparaison au groupe des rats témoins positifs par DMH (G4). En revanche, l'incorporation de l'écorce de grenade seule ou en association avec le probiotique provoque une augmentation du nombre de *Bifidobacterium* sp. et de *Lactobacillus* sp. chez les groupes G5 et G6 comparés au groupe témoin positif (G4).

L'ensemble de ces résultats nous laisse suggérer que l'écorce de grenade contribue à la prévention nutritionnelle des lésions précancéreuses coliques associées au stress oxydatif et à la dysbiose intestinale.

Cependant, pour consolider ces résultats plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Il est fort intéressant de :

- ✓ Evaluer l'activité antioxydante des extraits d'écorce de grenade par la méthode de DPPH
- ✓ Approfondir l'étude de l'influence de l'écorce de grenade en poudre vis à vis des altérations du microbiote intestinal via les techniques de biologie moléculaire (la méta-génomique intestinale).
- ✓ Evaluer l'effet de l'écorce de grenade /probiotique sur l'induction des gènes de la défense antioxydante (Catalase, Superoxyde dismutase, Glutathion peroxydase...), du cancer du côlon chimio-induit chez le rat Wistar.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abraham, I., El Sayed, K., Chen, Z. S., Guo, H. (2012). Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance. *Marine drugs*, 10(10), 2312-2321.

Adesokan, A. A., Akanji, M. A., Yakubu, M. T. (2007). Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark. *African journal of biotechnology*, 6(22).

Ahmed, H. H., El-Abhar, H. S., Hassanin, E. A. K., Abdelkader, N. F., and Shalaby, M. B. (2017). *Punica granatum* suppresses colon cancer through downregulation of Wnt/ β -Catenin in rat model. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 627-635.

Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: *Chemistry and food features*. *Food chemistry*, 174, 417-425.

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 Ethnopharmacology*, 60(3), 265-271.

Altunkaya, A. (2014). Potential antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts and synergism with added phenolic antioxidants in a liposome system: a preliminary study. *Irish journal of Agricultural and food Research*, 121-131.

Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International journal of food microbiology*, 134(3), 244-248

Ali, A. A. (2010). Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: a review. *Research Journal of Microbiology*, 5(12), 1213-1221.

Ali, M. S., Hussein, R. M.,Gaber, Y., Ammam, O.A., Kandeil, M. A. (2019). Modulation of JNK-1/ β -catenin signaling by *Lactobacillus casei*, inulin and their combination in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice. *RSC advances*, 9, 29368-29383.

Al-Mutairi, D. A., James, D. Craik, J.D., Batinic-Haberle, I., Benov , L. T. (2007). Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc *meta N* methylpyridylporphyrin. *Free Radical Research*, 41,1, 89-96.

Angelos, M. G., Kutala, V. K., Torres, C. A., He, G., Stoner, J. D., Mohammad, M., Kuppusamy, P. (2006). Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(1), H341-H347.

Azmi, A. S., Bao, B., & Sarkar, F. H. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3-4), 623-642.

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.

Bancroft, J.D., Gamble, M.(2008). Theory and practice of histological techniques. 6thed. Churchill Livingstone Elsevier, London.p724.

Bartsch, C., Bartsch, H. (1999). Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. In *Tryptophan, Serotonin, and Melatonin*. Springer, Boston, MA. pp 247-264

Bartsch, H., Nair, J. (2006). Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 391(5), 499-510.

Bastide, N. M., Pierre, F. H., Corpet, D. E. (2011). Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer prevention research*, 4(2), 177-184.

Bassiri-Jahromi, S. (2018). Punica granatum (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncology reviews*, 12(1).

Bassiri-Jahromi, S., Pourshafie, M.R., Mirabzadeh, E., Tavasoli,A.,Katirae,F., Mostafavi, E.,Abbasian,S. (2015).*Punica granatum* peel extract toxicity in mice.*Undishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*,10(4): e23770.

Basu, A., & Penugonda, K. (2009). Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition reviews*, 67(1), 49-56.

Belkacem, N., Djaziri, R., Lahfa, F., El-Haci, I.A., Boucherit, Z. (2014). Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of various *punica granatum* l. Peel extracts from algeria: a comparative study. *Phytothérapie* ,12:372-379.

Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., & Wahlefeld, A. W.(1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase.*Clinical chemistry*, 24(1), 58-73.

Bibiloni, R., Mangold, M., Madsen K.L., Fedorak, R.N., Tannock, G.W. (2006). The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of Medicine and Microbiology*,55(8), 1141-1150.

Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., & Kumar, K. (2013). Medicinal uses of Punica granatum and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(5).

Bialonska, D., Kasimsetty, S. G., Schrader, K. K., & Ferreira, D. (2009). The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8344-8349.

Bobek, P., Galbavý, Š., & Mariassyova, M. (2000). The effect of red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra*) fiber on alimentary hypercholesterolemia and chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Food/Nahrung*, 44(3), 184-187.

Bouhnik, Y., Flourie, B., Andrieux, C., Bisetti, N., Briet, F., Rambaud, J. C. (1996). Effects of *Bifidobacterium* sp. fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50(4), 269.

Bancroft, J.D., Gamble, M. (2008). Theory and practice of histological techniques. 6th ed. Churchill Livingstone Elsevier, London.p724.

Ben, Q., Sun, Y., Chai, R., Qian, A., Xu, B., Yuan, Y. (2014). Dietary fiber intake reduces risk for colorectal adenoma: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 146(3), 689-699.

Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bernstein, A. M., Song, M., Zhang, X., Pan, A., Wang, M., Fuchs, C. S., Le, N., Chan, A. T., Willett, W.C., Ogino, S., Giovannucci, E. L. (2015). Processed and unprocessed red meat and risk of colorectal cancer: analysis by tumor location and modification by time. *PLoS one*, 10(8), e0135959.

Beyaz, S., Mana, M. D., Roper, J., Kedrin, D., Saadatpour, A., Hong, S. J., Pinello, L. (2016). High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature*, 531(7592), 53-58.

Blandine, G. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodin®, Université grenoble, thèse de doctorat, pp190.

Bolognani, F., Rumney, C. J., Pool-Zobel, B. L., & Rowland, I. R. (2001). Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. *European journal of nutrition*, 40(6), 293-300.

Boutron, M. C., Faivre, J., Marteau, P., Couillault, C., Senesse, P., Quipourt, V. (1996). Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case-control study. *British Journal of Cancer*, 74(1), 145-151.

Boutron- Ruaul, M.C. (2007). Probiotiques et cancer colorectal. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21(2) : 85-88.

Braga, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., Jett, M., Takahashi, J. A., Carmo, L. S., Nascimento, A. M. A. (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of ethnopharmacology*, 96(1-2), 335-339.

Brenner, H., Haug, U., Arndt, V., (2010). Low risk of colorectal cancer and advanced adenomas more than 10 years after negative colonoscopy. *Gastroenterology* , 138,870-876.

Brody, H. (2015). Colorectal cancer. *Nature* 521. S1, <https://doi.org/10.1038/521S1a>.

Brown, G., Daniels, I. R. (2005). Preoperative staging of rectal cancer: the MERCURY research project. In *Rectal Cancer Treatment* (pp. 58-74). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bruce, W. R., Giacca, A., Medline, A. (2000). Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9(12), 1271-1279.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157-2241.

Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R.(2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481.

Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Holt, R. A. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome research*, 22(2) , 299-306.

Chang, J.H., Shim, Y. Y., Cha, S.K., Reaney, M. J., and Chee, K. M. (2012). Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. *Journal of Medical Microbiology*, 61(3), 361-368.

Chernane, H., Mansori, M., Latique, S., & El Kaoua, M. (2014). Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and its solvent fractions obtained from four moroccan macro algae species. *European Scientific Journal*, 10(15).

Chen, X.X., Lam, K. K.H., Feng, Y. (2018). Ellagitannins from Pomegranate Ameliorates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Rats while Enhancing Its Chemotoxicity against HT-29 Colorectal Cancer Cells through Intrinsic Apoptosis Induction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(27),1-44.

Chen, J., & Huang, X. F. (2015). High fat diet-induced obesity increases the formation of colon polyps induced by azoxymethane in mice. *Annals of translational medicine*, 3(6), 79. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.46>.

Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., & Singh, R. P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4791-4795.

Cherif, M. H., Zaidi, Z., Abdellouche, D., Hamdi, S., Lakhdari, N., Bendjazia, A. D., Laouamri, S., Mahnane, A., Moussaoui, H., Kadri, L., Guerra, D. (2010). Registre du cancer de Sétif (Algérie): incidence, tendance et survie, 1986–2005. *Journal africain du cancer/African Journal of Cancer*, 2(4): 245-258.

Choi, J.G., Kang, O.H., Lee, Y.S., Chae, H.S., Oh, Y.C., Brice, O.O., Kim, M.S., Sohn, D.H., Kim, H.S., Park, H., Shin, D.W., Rho, J.R., Kwon, D.Y. (2009). In vitro and in vivo antibacterial activity of *Punica granatum* peels ethanol extract against salmonella. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-8.

Clausen, M.R., Tvede, M., Mortensen, P.B. (1992). Short chain fatty acids in pouch contents from patients with and without pouchitis after pouch-anal anastomosis. *Gastroenterology*, 103(4),1144-1153.

Cohen, C., Cardoso, J.F., Garcia, S.B., Vannucchi, H.(2014). Vitamin E supplementation in chemical colorectal carcinogenesis: a two-edged knife. *Nutrients* , 6(8) :3214-3229.

Collins, D., Hogan, A. M., and Winter, D. C. (2011). Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncology*,12(5) :504-512.

Colombo, E., Sangiovanni, E., Dell'Agli, M. (2013).A Review on the Anti-Inflammatory Activity of Pomegranate in the Gastrointestinal Tract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013,1-11.

Cortés-Martín, A., García-Villalba, R., González-Sarriás, A., Romo-Vaquero, M., Loria-Kohen, V., Ramirez-de-Molina, A., Espín, J. C. (2018). The gut microbiota urolithin metabolites revisited: The human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. *Food & function*, 9(8),4100-4106.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.

Cullimore, R. D. (2000). Practical atlas for bacterial identification. Lewis Publisher. United States of America, pp72.

Cunningham, D., Atkin,W., Lenz, H.J., Lynch. H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet*, 375, 1030–1047.

Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., Nougayrède, J.P.(2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 107(25),11537-11579.

Dahle, L.K., Hill, E.C., Holman, R.T. (1962).The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 98(2),253-261.

Dahham, S. S., Ali, M. N., Tabassum, H., & Khan, M. (2010). Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum L.*). *Am. Eurasian Journal of Agriculture Environment Sciences*, 9(3), 273-281.

Daniluk, U. (2012). Probiotics, the new approach for cancer prevention and/or potentialization of anti-cancer treatment. *Journal of Clinical Experimental Oncology*, 1, 2.

Danial, E. N., & Basudan, N. (2019). Comparative study as antioxidant, antimicrobial activities and total phenolic content between various parts of pomegranate. *Research Journal of Life Sciences Bioinformatics*, 5(2), 6474-684.

Danesi, F., & Ferguson, L. R. (2017). Could pomegranate juice help in the control of inflammatory diseases?. *Nutrients*, 9(9), 958.

Debré, P., Le Gall, J. Y. (2014). Le microbiote intestinal. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 198(9), 1667-1684.

Djoudad-Kadji, H., Benslimane, S., Chevalier, C., Kadji, B., Exbrayat, J. M., Iguer-Ouada, M. (2011). Visualisation des coupes histologiques des follicules ovariens de *barbus callensis* variation de fixateurs et de colorants. *Revue française d'histotechnologie*, 24(1), 21-28.

Dhumal, S. S., Karale, A. R., Jadhav, S. B., & Kad, V. P. (2014). Recent advances and the developments in the pomegranate processing and utilization: a review. *Journal of Agriculture and Crop Science*, 1(1), 01-17.

De Moreno, A., Valdez, J., Perdigón, G. (2004). Inflammatory immune response. *European Journal of Inflammation*, 2(1), 21-31.

Delarras C.(2014). Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissure edition *Lavoisier* , pp 800.

Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., Hosseini, M. S., Sadrabad, E. K. (2018). Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 108– 111.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J.F.,Stocker, P. (2007).Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Journal of Food Research Technology*,224,801-809.

Dortu C., P. Fickers, Franz, C. M.A.P., Dora Ndagano. (2009).Characterisation of an Antilisterial Bacteriocin Produced by *Lactobacillus sakei* CWBI B1365 Isolated from Raw Poultry Meat and Determination of Factors Controlling its Production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1(1),75-84.

Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A. P., Giovannelli, L., Caderni, G.,& Cresci, A. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1-2), 237-246.

Domenico, T., Francesco, C., Maria, G.S., Vincenza, V., Mariateresa, C.D., Antonella,S., Gabriela, M., et Giuseppe, B. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2474-2478.

Drouault-Holowacz, S., Foligné, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., & Pot, B. (2006). Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolerance: in vitro and in vivo considerations. *Clinical Nutrition*, 25(6), 994-1003.

Duman, A. D., Ozgen, M., Dayisoğlu, K. S., Erbil, N., & Durgac, C. (2009). Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*, 14(5), 1808-1817.

Duerden, B. I. (1980). The isolation and identification of *Bacteroides* spp. from the normal human faecal flora. *Journal of Medical Microbiology*, 13(1), 69-78.

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K.E., Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.

Emiliano, J. Q., Pilar, J., Irma, C., Jesús, T. (2014).Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review . *Food and Nutrition Sciences*, 5(18),1765-1775.

Eschwege, P., Ledinghen, V., Camilli, T., Kulkarni, S., Dalbagni, G., Droupy, S., Jardin, A., Benoit, G., Weksler, B.B . (2001). Les cyclooxygénases. *La Presse Médicale (Paris, France: 1983)*, 30(10), 511.

El-Shafie, H. A., Yahia, N. I., Ali, H. A., Khalil, F. A., El-Kady, E. M., & Moustafa, Y. A. (2009). Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus plantarum* NRRL-B-4524 and *Lactobacillus paracasei* in mice with hypercholesterolemia induced by diet. *Australian Journal of Basic Applied Science*, 3, 218-228.

Eslami, M., Yousefi, B., Kokhaei, P., Hemati, M., Nejad, Z. R., Arabkari, V., Namdar, A. (2019). Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *Journal of cellular physiology*, 234(10), 17127-17143.

Fahmy, H., Hegazi, N., El-Shamy, S., Farag, M.A. (2020). Pomegranate juice as a functional food: a comprehensive review of its polyphenols, therapeutic merits, and recent patents. *Food and function*, 7,1-27.

FAO., WHO. (2002). Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Canada

Fasce, C.F.(1982). Serum Cholesterol determined colorimetrically with enzyme. *Clinical Chemistry*, 18: 901

Fatima, S., Hu, X., Huang, C., Zhang, W., Cai, J., Huang, M., Gong, R. H., Chen, M., Ho, A., Su, T., Wong, H., Bian, Z., & Kwan, H. Y. (2019). High-fat diet feeding and palmitic acid increase CRC growth in β 2AR-dependent manner. *Cell death & disease*, 10(10), 711.

Faure, P., Lafond, J. L. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkhäuser Basel. pp. 237-248

Farag, R., Abdelatif, M., Emam, S., Tawfeek, L. (2014). Phytochemical screening and polyphenol constituents of pomegranate peels and leave juices. *Agriculture Soil Sciences*, 1(6), 86-93.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 11, 108-117.

Fava, F., Gitau, R., Griffin, B. A., Gibson, G. R., Tuohy, K. M., Lovegrove, J. A. (2013). The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *International Journal of Obesity*, 37(2), 216-223.

Fawole, O. A., Opara, U. L., & Theron, K. I. (2012). Chemical and phytochemical properties and antioxidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2934-2940.

Felhi, S., Daoud, A., Hajlaoui, H., Mnafigui, K., Gharsallah, N., Kadri, A. (2017). Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial

activities and functional group analysis of Ecballium elaterium seeds and peels fruits. *Food Science and Technology*, 37,1-10.

Foligné, B., Nutten, S., Steidler, L., Dennin, V., Goudercourt, D., Mercenier, A., Pot, B. (2006). Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects. *Digestive diseases and sciences*, 51(2), 390-400.

Friedewald, W.T., Levy, R.T., Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use the preparative ultracentrifuse. *Clinical Chemistry*, 18: 499-502.

Fay, M. P., Freedman, L. S., Clifford, C. K., Midthune, D. N. (1997). Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Research*, 57(18), 3979-3988.

Fearon, E. R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 479-507.

Femia, A. P., Caderni, G. (2008). Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta medica*, 74(13), 1602-1607.

Fernandes, L., Pereira, J. A., López-Cortés, I., Salazar, D. M., González-Álvarez, J., Ramalhosa, E. (2017). Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Spain. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1799-1814.

Fischer, U. A., Carle, R., Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food chemistry*, 127(2), 807-821

Fossati, P., Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*, 28(10), 2077-2080.

Friedewald, W. T., Levy, R. I., Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*, 18(6), 499-502.

Gan, R. Y., Kuang, L., Xu, X. R., Zhang, Y., Xia, E. Q., Song, F. L., Li, H. B. (2010). Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. *Molecules*, 15(9), 5988-5997.

Galdeano, C. M., De Leblanc, A. D. M., Vinderola, G., Bonet, M. B., Perdigon, G. (2007). Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and vaccine immunology*, 14(5), 485-492.

Ghasemzadeh A. & Ghasemzadeh N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31) : 6697-6703.

Genena, D.M., Agamy, N.F. (2017). Effect of pomegranate juice and peel on antioxidant enzymes and lipid profile in carbon tetrachloride-induced hyperlipidemic rats. *International Journal of Advanced Research*, 5(1) :1708- 1714.

- Gullon, B., Pintado, M. E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M. (2015).** In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628.
- Gullon, B., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M. (2016).** Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food Control*, 59, 94-98.
- Grujic, N., Lepojevic, Z., Srdjenovic, B., Vladic, J., Sudji, J. (2012).** Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. *Molecules*, 17(3), 2518-2528.
- Grimm, .V, Radulovic, K., Riedel, C.U. (2015).** Colonization of C57BL/6 mice by a potential probiotic *Bifidobacterium bifidum* strain under germ-free and specific pathogen-free conditions and during experimental colitis. *PLoS One*, 10(10): e0139935.
- Goodman, J.E., Hofseth, L.J., Hussain, S.P ., Harris, C.C. (2004).**Nitric oxide and p53 in cancerprone chronic inflammation and oxyradical overload disease. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(1):3-9.
- Goulet, O., Turck, D., Vidailhet, M (2012).** Alimentation de l'enfant en situations normale et pathologique.*DOIN, collection Progrès en pédiatrie*, pp 662.
- Goulet, O., Colomb-Jung, V., Joly, F.(2009).**Role of the colon in short bowel syndrome and intestinal transplantation.*Journal of Pediatr Gastroenterology and Nutrition*, 2: 66-71.
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., Uchida, K. (2010).**Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research*, 44(10): 1098–1124.
- Gomez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Carretero A.S.(2006).**Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4):1220-1254.
- Gupta, R., Jeevaratnam, K., Fatima, A. (2018).**Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 5(10) : 411-424.
- Giovannucci, E., Willett, W. C. (1994).** Dietary factors and risk of colon cancer. *Annals of medicine*, 26(6), 443-452.
- Glauert, H. P. (2019).** Dietary fatty acids and cancer. *The Open Nutrition Journal*, 13(1):27-42.
- Gonda, T. A., Tu, S., Wang, T. C. (2009).** Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell cycle*, 8(13), 2005-2013.
- Golay, A. (1998).** The role of dietary fat in the development of obesity. *Oleagineux Corps Gras Lipides (France)*. 5,205-207.

Grivennikov, S. I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. In *Seminars in immunopathology*, 35 (2), 229-244.

Hadrich, F., Cherif, S., Talel, Gargouri, .Y, Sayari, A. (2014). Antioxydant and lipase inhibitory activities and essential oil composition of pomegranate peel extract. *Journal of Oleon Science* ,63, 515-525.

Hamiza, O.O, Rehman, M.U., Tahir, M., Khan, R., Khan, A.Q., Lateef, A., Sultana, S.(2012). Amelioration of 1, 2 Dimethylhydrazine (DMH) induced colon oxidative stress, inflammation and tumor promotion response by tannic acid in Wistar rats. *Asian of Pacific Journal of Cancer Preventive*,13, 4393-4402.

Hammes, W. P., Knauf, H. J., Vogel, R. F., (1992). Cloning sequence, and phenotypic expretion of Kats A, Which encodes the catalase of *Lactobacillus Sake* LTH 677. *Applied of Environmental Microbiology*, 58(3); 832-9

INSP (2012).Registre des tumeurs, Alger.

Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F., Bouhadi, D. (2009). Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube.*Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*, 37–55.

Hasnaoui, N., Wathelet, B., & Jiménez-Araujo, A. (2014). Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food chemistry*, 160, 196-203.

Hmid, I., Elothmani, D., Hanine, H., Oukabli, A., Mehinagic, E. (2017). Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2675-S2684.

Howell , A. B. D'Souza, D. H., (2013) .The Pomegranate: Effects on Bacteria and Viruses That Influence Human Health, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, DOI: 10.1155/2013/606212.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2), 205-215.

Hossin, F. L. A. (2009). Effect of pomegranate (*Punica granatum*) peels and it's extract on obese hypercholesterolemic rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(8), 1251-7.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

Hooper, L.V. (2004). Bacterial contributions to mammalian gut development.*Trends Microbial*, 12 (3), 129-34.

Hodge, A. M., Williamson, E. J., Bassett, J. K., MacInnis, R. J., Giles, G. G., English, D. R. (2015). Dietary and biomarker estimates of fatty acids and risk of colorectal cancer. *International journal of cancer*, 137(5), 1224-1234.

Howell, A. B., & D'Souza, D. H. (2013). The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Ismail, T., Sestili, P., Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 397-405.

Ito, H.(2011). Metabolites of the ellagitannin geraniin and their antioxidant activities. *Planta Medica*, 77(11), 1110-1115.

Ito, C., Itoigawa, M., Miyamoto, Y., Onoda, S., Rao, K.S., Mukainaka, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H.(2003). Polyprenylated benzophenones from *Garcinia assiguand* and their potential cancer chemopreventive activities. *Journal of Nature Production*. 66, 206-209.

Ivanov, I. I., de Llanos Frutos, R., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D. B., Sartor, R. B., Littman, D. R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell host & microbe*, 4(4), 337-349.

Janakiram, N. B., Rao, C. V. (2014). The role of inflammation in colon cancer. In *Inflammation and cancer* ,pp. 25-52.

Järvinen, R., Knekt, P., Hakulinen, T., Rissanen, H., Heliövaara, M. (2001). Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. *British journal of cancer*, 85(3), 357-361.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.

Johanningsmeier, S. D., & Harris, G. K. (2011). Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual review of food science and technology*, 2, 181-201.

Joosen, A. M., Kuhnle, G. G., Aspinall, S. M., Barrow, T. M., Lecommandeur, E., Azqueta, A., Bingham, S. A. (2009). Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 30(8), 1402-1407.

Jucá, M. J., Bandeira, B. C., Carvalho, D. S., Leal, A. T. (2014). Comparative study of 1, 2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)*, 34(3), 167-173.

Kahouli, I., Malhotra, M., Westfall, S., Alaoui-Jamali, M. A., & Prakash, S. (2017). Design and validation of an orally administrated active *L. fermentum*-*L. acidophilus* probiotic formulation using colorectal cancer Apc Min/+ mouse model. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(5), 1999-2019.

Kaizu, H., Sasaki, M., Nakajima, H., & Suzuki, Y. (1993). Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2493-2499.

Kasimsetty, S., Bialonska, D., Reddy, M. K., Ma, G., Khan, S. I., Ferreira, D. (2010). Influence of Pomegranate Elalgitannins and their Intestinal Microbial Metabolites on HT-29 Colon Cancer Cells. *Planta Medica*, 76(05), P106.

- Keddari, S., Aldib, I., & Riazi, A. (2014).** In vivo stimulatory effects of wheat bran on intestinal microbial ecosystem of mice. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 4(1), 24-32.
- Kim, H. K., Jeong, T.S., Lee, M.K., Park, Y. B., and Choi, M.S. (2003).** Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clinica Chimica Acta*, 327(1-2), 129-137.
- Kim, J. H., Park, H. E., Cho, N. Y., Lee, H. S., Kang, G. H. (2016).** Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *British journal of cancer*, 115(4), 490-496.
- Kim, J. Y., Ok, E., Kim, Y. J., Choi, K. S., Kwon, O. (2013).** Oxidation of fatty acid may be enhanced by a combination of pomegranate fruit phytochemicals and acetic acid in HepG2 cells. *Nutrition research and practice*, 7(3), 153-159.
- Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1996).** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87 (2), 159-170.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S.S. (2010).** Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126.
- Kleniewska, P., Pawliczak, R. (2017).** Influence of synbiotics on selected oxidative stress parameters. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, ID 9315375.
- Kohn, H. I. and Liversedge, M. (1944).** On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, epinephrine and menadione. *Journal of Pharmacology*, 82, 292-7
- Koehne, C.H., Dubois, R.N.(2004).** COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Seminars in Oncology*, 31:12–21.
- Korada, S., Nagendra, S., Himabindu, P., Vijendra, M. (2015).** Colon Cancer Prevention through Probiotics. *Science and Therapy*, 7(2) :81-92.
- Kostic, A. D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J. N., Gallini, C. A., Michaud, M., El-Omar, E. M. (2013).** Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell host & microbe*, 14(2), 207-215.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., Van Wichen, D., De Weger, R., Kinzler, K. W., Clevers, H. (1997).** Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*, 275(5307), 1784-1787.
- Kroncke K.D. (2003).** Nitrosative stress and transcription. *Biological Chemistry*, 384(10-11),1365–1377.
- Krstic, R. V. (1991).** Human Microscopic Anatomy. An atlas for students of medicine and biology. *Springer-Verlag*, Berlin.pp 616.
- Kulkarni, S.D., Acharya, R., Rajurkar, N.S., Reddy, A.V.R. (2007).** Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by *in vitro* digestion method. *Food Chemistry*, 103(2), 681-688.

Kruger, C., Zhou, Y. (2018). Red meat and colon cancer: A review of mechanistic evidence for heme in the context of risk assessment methodology. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 131-153.

Kunzmann, A. T., Coleman, H. G., Huang, W. Y., Kitahara, C. M., Cantwell, M. M., Berndt, S. I. (2015). Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *The American journal of clinical nutrition*, 102(4), 881-890.

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

Larpent, J. P., Larpent, M. (1990). Memento technique de microbiologie. Second ed. *Technique et documentaire de Lavoisier*.pp 417.

Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A, Espín, J.C.(2006). The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *Journal of Nutrition and Biochemistry*,17,611-625.

Lee, J.S., Choi, M.S., Jeon, S.M., Jeong, T.S., Park, Y.B., Lee, M.K., Bok, S.H. (2003). Lipid-lowering and antioxidative activities of 3,4-di(OH)-cinnamate and 3,4-di(OH) hydrocinnamate in cholesterol-fed rats. *Clinica Chimica Acta*, 314, 221-230.

Lee, J.W., Shin, J.G., Kim, E.H., Kang, H.E., Yim, I.B., Kim, J.Y., Joo, H.G., Woo, H.J. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Veterenary Science*, 5, 41-48.

LeBlanc, A.M., Perdigón, G. (2005). Reduction of beta-glucuronidase and nitro-reductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. *Biocell Mendoza*, 29: 1-17.

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*,96, 254-260.

Li, T., Chiang, J.Y., (2014). Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacological Review*, 66:948-983.

Liu, H., Liu, X., Zhang, C., Zhu, H., Xu Q.,Bu, Y., Lei, Y.(2017). Redox Imbalance in the Development of Colorectal Cancer. *Journal of cancer* ,8(9),1586-1597.

Liong, M. T., & Shah, N. P. (2006). Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. *Journal of dairy science*, 89(5), 1390-1399.

Louis, P., Hold, G. L., Flint, H. J. (2014).The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer.*National Review of Microbiogyl*, 12(10): 661-72.

Lacave, R., Larsen, C. J., Robert, J. (2005). *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext.

- Levin, B., Bond, J. H. (1996).** Colorectal cancer screening: recommendations of the US Preventive Services Task Force. *Gastroenterology*, 111(5), 1381-1384.
- Levine, A. J. (1997).** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *cell*, 88(3), 323-331.
- Lièvre, A., & Laurent-Puig, P. (2010).** La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancero digest*, 2(1): 38-42.
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R. S., Taniguchi, K., Krishnadath, K. K., Halling, K. C., Cunningham, J. M., Boardman, L. A., Qian, C.(2000).** Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nature Genetics*. 26, 146-147.
- Madrigal-Carballo, S. Rodriguez, G.Krueger, C.G., Dreher, M., Reed, J.D. (2009).** Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: Authenticity, antioxidant and polyphenol composition . *Journal of Functional Foods*,1, (3), 324-329.
- Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A., & Calhau, C. (2015).** High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*, 5(1), 11–21.
- MacFarlane, A. J., & Stover, P. J. (2007).** Convergence of genetic, nutritional and inflammatory factors in gastrointestinal cancers. *Nutrition reviews*, 65(suppl3), S157-S166.
- Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., & Mukhtar, H. (2005).** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14813-14818.
- Malviya, S., Jha, A., & Hettiarachchy, N. (2014).** Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of food science and technology*, 51(12), 4132-4137.
- Mario, J. J., Bruno, C. B., Davi, S. C., Antenor, T. L. (2014).**Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats, *Journal of Coloproctologie*, 3 4(3):167–173.
- Mansour, E., Ben Khaled, A., Lachiheb, B., Abid, M., Bachar1 Kh., and Ferchichi, A. (2013).**Phenolic Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Peel Extract from Tunisian Pomegranate .*Journal of Agriculture Science Technology*,15: 1393-1403.
- Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin , Paris, pp508.
- Marnett, L.J. (1999).** Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424(1-2) : 83-95.
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., & Bruewer, M. (2009).** Probiotic mixture VSL 3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American journal of physiology-Gastrointestinal and liver physiology*, 296: G1140–G1149.

Milane, H.(2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. pp : 13-36.

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197.

Martínez, M. E. (2005). Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. In *Tumor Prevention and Genetics III* (pp. 177-211). Springer, Berlin, Heidelberg.

McKeown-Eyssen. G.(1994). Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Pre.*, 3: 687-695.

Mena, P., García Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1893-1906.

Middha, S. K., Usha,T., Pande,V. (2013).HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *punica granatum* fruit peel. *Advances in Pharmacological Sciences*.1-6.

Migdal, C., Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27 (4), 405-412.

Miyamoto, Y., & Itoh, K. (2000). *Bacteroides acidifaciens* sp. nov., isolated from the caecum of mice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(1), 145-148.

Moen, B., Henjum, K., Måge, I., Knutsen, S. H., Rud, I., Hetland, R. B., & Paulsen, J. E. (2016). Effect of dietary fibers on cecal microbiota and intestinal tumorigenesis in azoxymethane treated A/J Min/+ mice. *PLoS One*, 11(5), e0155402.

Morois, S., Boutron-Ruault, M. C. (2012). Nutrition et cancer colorectal. *Cancéro digest*, 4 (3), 109-117.

Mphahlele, R. R., Fawole, O. A., Mokwena, L. M., Opara, U. L. (2016). Effect of extraction method on chemical, volatile composition and antioxidant properties of pomegranate juice. *South African Journal of Botany*, 103, 135-144.

Moore, W.E., Moore, L.H. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9): 3202-7.

Murillo, G., Mehta, R.G. (2005). Chemoprevention of chemically-induced mammary and colon carcinogenesis by 1alpha-hydroxyvitamin D5. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*,97:129–136

McLeod, A., Nyquist, O. L. Snipen, L., Naterstad,K., Axelsson, L.(2008).Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology* , 31(5):393-403.

Muzny, D. M., Bainbridge, M. N., & Chang, K. (2012). Dinh hh, Drummond JA, Fowler G, Kovar CL, Lewis LR, Morgan MB, Newsham IF, et al: Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330-337.

Nigam, A. Knight, J., Williams, N. (2019). Gastrointestinal tract 5: the anatomy and functions of the large intestine. *Nursing Times*, 115, 10, 50-53.

Naziri, Z., Rajaian, H., & Firouzi, R. (2012). Antibacterial effects of Iranian native sour and sweet pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts against various pathogenic bacteria.

Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. A., & Sayeed, S. A. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compound from *Punica granatum*. *Journal of food science*, 72(9), M341-M345.

Neyrinck, A. M., Van Hée, V. F., Bindels, L. B., De Backer, F., Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2013). Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *British Journal of Nutrition*, 109(5), 802-809.

Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food chemistry*, 80(3), 393-397.

Nguyen, H. T., Duong, H. Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology letters*, 16(1), 9-18

Neuville, A. (2010). Carcinogénèse colique : sous typage moléculaire des étapes précoces du cancer du côlon de phénotype non-MIN, Thèse doctorat en science de la vie et de sante. Université de Strasbourg; 97.

Nozohour, Y., Golomohammadi, R., Mimejad, R., Fartashvand, M. (2018). Antibacterial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed and peel alcoholic extracts *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from health centers. *Journal of Applied Biotechnology*, 5(1):23-36.

Nistal, E., Fernández-Fernández, N., Vivas, S., Olcoz, J. L. (2015). Factors determining colorectal cancer: the role of the intestinal microbiota. *Frontiers in oncology*, 5, 220.

Nojadeh, J. N., Sharif, S. B., Sakhinia, E. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI Journal*, 17, 159.

Okada, G., Ueda, J., Tanabe, S., Belev, G., Wysokinski, T., Chapman, D., Kasap, S. (2014). Samarium-doped oxyfluoride glass-ceramic as a new fast erasable dosimetric detector material for microbeam radiation cancer therapy applications at the Canadian synchrotron. *Journal of the American Ceramic Society*, 97(7), 2147-2153.

Oberreuther-Moschner, D. L., Jahreis, G., Rechkemmer, G., & Pool-Zobel, B. L. (2004). Dietary intervention with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29 clone 19A cells. *British Journal of Nutrition*, 91(6), 925-932.

Olivier, S.S. Mir, A.M. Michalski, J.C. Lefebvre, T. (2011). Signalisation et prédispositions métaboliques liées au cancer colorectal. *Médecine/Sciences*, 27 , 514-534.

O'mahony, L., Feeney, M., O'halloran, S., Murphy, L., Kiely, B., Fitzgibbon, J., & Collins, J. K. (2001). Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 15(8), 1219-1225.

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

Ouwehand, A.,Vesterlund, S. (2003). Health aspects of probiotics. *IDrugs: the investigational drugs journal*, 6(6), 573-580.

Padua, D., Massagué, J. (2009). Roles of TGF β in metastasis. *Cell research*, 19(1), 89-102.

Paillas, S., Boissière, F., Bibeau, F., Denouel, A., Mollevi, C., Causse, A., Denis, V., Vezzio-Vié, N., Marzi, L., Cortijo, C., Ait-Arsa, I. (2011). Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer research*, 71(3), 1041-1049.

Pal, J. Raju, C.V. Lakshmisha IP, Prakash, A. K., Pandey, G., Kumar Singh,R.R. Sarojini, A.,and Amitha.(2017).Comparatives study of antioxidant activity and total phenolic contents of pomegranate and orange peels extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* ,6(6): 1359-1362.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2.

Park, E., Jeon, G., Park, J., Paik, H. (2007). A probiotic strain of bacillus polyfermenticus reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rat. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30(3):569-574.

Patel, C., Dadhaniya, P., Hingorani, L., Soni, M.G. (2008).Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chemistry Toxicology* ,46(8):2728-2763.

Perše, M., & Cerar, A.(2011). Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *BioMed Research International*, 2011.

Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., Ed-Dra, A. (2016). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de septplantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*, 14,355-362.

Puccio, G., Cajozzo, C., Meli, F., Rochat, F., Grathwohl, D., Steenhout, P. (2007). Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live Bifidobacterium longum BL999 and prebiotics. *Nutrition*, 23(1), 1-8.

- Prashanth, D., Asha, M. K., Amit, A. (2001).** Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, 72(2), 171-173.
- Pani, S., Cook, E. J., Horrocks, J. A., Jones, J. L., Speller, R. D. (2010).** Characterization of breast tissue using energy-dispersive X-ray diffraction computed tomography. *Applied Radiation and Isotopes*, 68(10), 1980-1987.
- Park, S. Y., Kim, J. S., Seo, Y. R., Sung, M. K. (2012).** Effects of diet-induced obesity on colitis-associated colon tumor formation in A/J mice. *International journal of obesity*, 36(2), 273-280.
- Park, S., Seok, J. K., Kwak, J. Y., Suh, H. J., Kim, Y. M., & Boo, Y. C. (2016).** Anti-inflammatory effects of pomegranate peel extract in THP-1 cells exposed to particulate matter PM10. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Qadir, F.A., Sabr, Z.N., Sabr, D.R.(2013).** Effect of pomegranate, sumac, and alovera extract on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Citrobacter* isolated from urinary tract infection. *Egypt Journal of Experimental Biology* ,9(1),41-48.
- Qin, W., Shi, Y., Zhao, B., Yao, C., Jin, L., Ma, J., Jin, Y. (2010).** miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PloS one*, 5(2), e9429.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Gírbés, T. (2014).** Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765.
- Rafter, J. (2004).** The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutrition research reviews*, 17(2), 277-284.
- Rafter, J. (2002).** Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition*, 88(S1), S89-S94.
- Ramzy,M.(2019).** Role of pomegranate peel on ameliorated hyperglycemia and hypercholesterolemia in experimental rats. *Journal of Medicine in Scientific Research*, 2(3) :185-190.
- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., Ferreira, D. (2007).** Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta medica*, 53(05), 461-467.
- Reddy, D.S., Hamid, R ., Rao, C.V. (1997).** Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis*, 18, 1371-1374.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010).** Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Rowayshed, G., Salama, A., Abul-Fadl, M., Akila-Hamza, S., & Mohamed, E. A. (2013).** Nutritional and chemical evaluation for pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peel and seeds powders by products. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 3(4), 169-179.

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57(1), 1-24.

Rosenberg, D.W., Giardina, C., Tanaka, T. (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 30, 183–96.

Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe*, 14(2), 195-206.

Rahimi, H. R. Arastoob M., Ostada. S.,N., (2012). A Comprehensive Review of *Punica granatum* (Pomegranate) Properties in Toxicological, Pharmacological, Cellular and Molecular Biology Researches. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (2), 385-400.

Reddy, B. S., Engle, A., Simi, B., Goldman, M. (1992). Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology*, 102(5), 1475-1482.

Reddy, B. S., Maeura, Y. (1984). Tumor promotion by dietary fat in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats: influence of amount and source of dietary fat. *Journal of the National Cancer Institute*, 72(3), 745-750.

Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta medica*, 53(05), 461-467.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.

Riboli, E., Kaaks, R., Estève, J. (1996). Nutrition and laryngeal cancer. *Cancer Causes & Control*, 7(1), 147-156.

Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*, 47(2), 241-259.

Roper, J., Tammela, T., Cetinbas, N. M., Akkad, A., Roghanian, A., Rickelt, S., Park, Y. K. (2017). In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis. *Nature biotechnology*, 35(6), 569-576.

Rosenberg, D. W., Giardina, C., Tanaka, T. (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 30(2), 183-196.

Rouhi, S. Z. T., Sarker, M. M. R., Rahmat, A., Alkahtani, S. A., Othman, F. (2017). The effect of pomegranate fresh juice versus pomegranate seed powder on metabolic indices, lipid profile, inflammatory biomarkers, and the histopathology of pancreatic islets of Langerhans in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic Sprague–Dawley rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 156.

Sadik, N. A. H., & Shaker, O. G. (2013). Inhibitory effect of a standardized pomegranate fruit extract on Wnt signalling in 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Digestive diseases and sciences*, 58(9), 2507-2517.

Sadowska-Bartosz, I., Galiniak, S., & Bartosz, G. (2014). Kinetics of glycooxidation of bovine serum albumin by glucose, fructose and ribose and its prevention by food components. *Molecules*, 19(11), 18828-18849.

Sadeghipour, A., Eidi, M., Ilchizadeh Kavgani, A., Ghahramani, R., Shahabzadeh, S., & Anissian, A. (2014). Lipid lowering effect of Punica granatum L. peel in high lipid diet fed male rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

Saito, Y, Nishimiya, H., Kondo, Y., Sagae, T.(2017).The influence of probiotics on individual fecal secondary bile acid levels: atwo-case studyofschizophrenic patients receiving an atypical antipsychotic drug. *Functional Foods in Health and Disease*, 7(11),849-858.

Saladin, K. S. (2014). Human anatomy (4th ed.). New York: McGraw Hill.

Salwe, K.J., Sachdev, D.O., Bahurupi, Y.,Kumarappan,M.(2015). Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. *Journal of Natural Science Biology Medicine*, 6(1),56-62.

Sanchez, M. A., Bowen, D. J., Hart, A., Spigner, C. (2007). Factors influencing prostate cancer screening decisions among African American men. *Ethnicity and Disease*, 17(2), 374.

Sandhu, M. S., Luben, R., Khaw, K. T. (2001). Self reported non-insulin dependent diabetes, family history, and risk of prevalent colorectal cancer: population based, cross sectional study. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 55(11), 804-805.

Saud, S. M., Li, W., Morris, N. L., Matter, M. S., Colburn, N. H., Kim, Y. S., Young, M. R. (2014). Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of Kras activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic Kras expression. *Carcinogenesis*, 35(12), 2778-2786.

Sartor,R. B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134(2), 577-594.

Sarniguet, C. (2016). Étude de l'effet co-initiateur du fer héminique et du 4-hydroxynonéol, un produit d'oxydation des lipides insaturés, sur la cancérogenèse colorectale chez le rat: dénombrement des foyers de cryptes aberrantes. Thèse de doctorat, Université de Toulouse , France .

Scanlan, P. D., Shanahan, F., Clune, Y., Collins, J. K., O'Sullivan, G. C., O'Riordan, M., Marchesi, J. R. (2008). Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environmental microbiology*, 10(3), 789-798.

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453-R462.

Schrauwen-Hinderling, V. B., Kooi, M. E., Hesselink, M. K., Moonen-Kornips, E., Schaart, G., Mustard, K. J., Schrauwen, P. (2005). Intramyocellular lipid content and molecular adaptations in response to a 1-week high-fat diet. *Obesity research*, 13(12), 2088-2094.

Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., & Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(4), 1415-1422.

Selma, M. V., González-Sarriás, A., Salas-Salvadó, J., Andrés-Lacueva, C., Alasalvar, C., Örem, A., Espín, J. C. (2018). The gut microbiota metabolism of pomegranate or walnut ellagitannins yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: Comparison between normoweight, overweight-obesity and metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*. 37(3) :897-905.

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.

Sesink, A. L., Termont, D. S., Kleibeuker, J. H., Van der Meer, R. (1999). Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer research*, 59(22), 5704-5709.

Shah, T. A., Parikh, M., Patel, K. V., Patel, K. G., Joshi, C. G., Gandhi, T. R. (2016). Evaluation of the effect of *Punica granatum* juice and punicalagin on NFκB modulation in inflammatory bowel disease. *Molecular and cellular biochemistry*, 419(1-2), 65-74.

Shebbo, S., El Joumaa, M., Kawach, R., & Borjac, J. (2020). Hepatoprotective effect of *Matricaria chamomilla* aqueous extract against 1, 2-Dimethylhydrazine-induced carcinogenic hepatic damage in mice. *Heliyon*, 6(6), e04082.

Sheidai, M., Kolahizadeh, S., Noormohammadi, Z., Azani, N., Nikoo, M. (2012). Correlation between geography and cytogenetic diversity in Pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Iran. *Acta Botanica Brasílica*, 26(4), 953-965.

Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., & Rafieian-Kopaei, M. (2016). A review study on *Punica granatum* L. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 21(3), 221-227.

Sharma, M., Li, L., Celver, J., Killian, C., Kovoov, A., Seeram, N.P. (2010). Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7):3965–9.

Shaban, N. Z., El-Kersh, M. A., El-Rashidy, F. H., & Habashy, N. H. (2013). Protective role of *Punica granatum* (pomegranate) peel and seed oil extracts on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatic injury in male rats. *Food chemistry*, 141(3), 1587-1596.

Sharma, P., McClees, S. F., Afaq, F. (2017). Pomegranate for prevention and treatment of cancer: an update. *Molecules*, 22:177.

Shiban, M.S., Al-Otaibi, M. M., Al-Zoreky N.S.(2012).Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *Food and Nutrition Sciences*, 3(7).991-996.

Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(1), 81-86.

Sivamaruthi, B.S., Kesika, P., Chaiyasut, C.(2020). The Role of Probiotics in Colorectal Cancer Management. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,1-17.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.

Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann. NY Acad. Sci*, 1348(1), 20-31.

Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.

Sorrenti, V., Randazzo, C. L., Caggia, C., Ballistreri, G., Romeo, F. V., Fabroni, S., ... & Vanella, L. (2019). Beneficial effects of pomegranate peel extract and probiotics on pre-adipocyte differentiation. *Frontiers in microbiology*, 10, 660.

Spilmont, M., Léotoing, L., Davicco, M. J., Lebecque, P., Mercier, S., Miot-Noirault, E., Coxam, V. (2014). Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis. *European journal of nutrition*, 53(5), 1155-1164

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 Mélanie Spilmont, thèse de doctorat, Université d'Auvergne, France.

Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Lochs, H. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122(1), 44-54

Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 62:797-821

Stover, E. D., & Mercure, E. W. (2007). The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. *HortScience*, 42(5), 1088-1092.

Stewart, B. W., & Wild, C. P. (2014). World cancer report 2014. Lyon, France: International agency for research on cancer. *World Health Organization*, 630.

Sun, Y.Q., Tao, X., Men, X.M., Xu, Z.W.(2017). In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8), 1808-1818.

Spilmont, M., Leotoing, L., Miot-Noirault, E., Rios, L., Wittrant, Y., Coxam, V. (2013). Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis. In *20. International Congress of Nutrition* (Vol. 63.). Karger. pp. 1960.

Srihari, T., Balasubramaniyan, V., Nalini, N. (2008). Role of oregano on bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental colon carcinogenesis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86:667-674.

Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyak, H., Niitsu, Y. (1998). Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *New England Journal of Medicine*, 339(18), 1277-1284.

Taranto, M. P., Medici, M., Perdigon, G., Holgado, A. R., & Valdez, G. F. (1998). Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *Journal of dairy science*, 81(9), 2336-2340.

Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., & Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum L.*) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1523-1527.

Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M. L., Shah, D., Jain, P., Saha, S., & Prakash, S. (2014). Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an in vitro investigation. *BioMed research international*, 2014.

Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Coussa-Charley, M., Al-Salami, H., Jones, M., Prakash, S. (2012). *Lactobacillus fermentum* NCIMB 5221 has a greater ferulic acid production compared to other ferulic acid esterase producing *Lactobacilli*. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 7(1), 23-32.

Thirabunyanon, M., & Hongwittayakorn, P. (2013). Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(2), 511-525.

Toral, M., Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Romero, M., Sánchez, M., Utrilla, M. P., & Duarte, J. (2014). The probiotic *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and pro-inflammatory status in obese mice. *Clinical Science*, 127(1), 33-45.

Tortora G.J., Grabowski S.R. (1994).Principes d'anatomie et de physiologie.*De Boeck Bruxelles*, pp 1121.

Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114.

Thangaraj, K., Natesan, K., Settu, K., Palani, M., Govindarasu, M., Subborayan, V., Vaiyapuri, M.(2018). Orientin mitigates 1, 2-dimethylhydrazine induced lipid peroxidation, antioxidant and biotransforming bacterial enzyme alterations in experimental rats. *Journal of Cancer Research Therapeutics*,14:1379-1388.

Thun, M. J., Henley, S. J., Patrono, C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(4), 252-266.

Tilg, H., Kaser, A. (2011). Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2126-2132.

- Torlakovic, E., Skovlund, E., Snover, D. C., Torlakovic, G., Nesland, J. M. (2003).** Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *The American journal of surgical pathology*, 27(1), 65-81.
- Torre, L. A., Bray F., Siegel, R. L., Ferlay ,J., Lortet-Tieulent,J., Jemal,A.(2015).** A Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*,65, 87-108.
- Trush, M. A., & Kensler, T. W. (1991).** An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 10(3-4), 201-209.
- Trindade de Paula, M., Poetini Silva, M. R., Machado Araujo, S., Cardoso Bortolotto, V., Barreto Meichtry, L., Zemolin, A. P. P., Prigol, M. (2016).** High-fat diet induces oxidative stress and MPK2 and HSP83 gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Tsang, A. H. F., Cheng, K. H., Wong, A. S. P., Ng, S. S. M., Ma, B. B. Y., Chan, C. M. L., Wong, S. C. C. (2014).** Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma. *World Journal of Gastroenterology*, 20(14), 3847-3857.
- Turner, N. D., Lloyd, S. K. (2017).** Association between red meat consumption and colon cancer: A systematic review of experimental results. *Experimental biology and medicine*, 242(8), 813-839.
- Uhry, Z., Belot, A., Colonna, M., Bossard, N., Rogel, A., Iwaz, J., Mitton, N., Grosclaude, P., Remontet, L. (2013).** National cancer incidence is estimated using the incidence/mortality ratio in countries with local incidence data: Is this estimation correct?. *Cancer epidemiology*, 37(3), 270-277.
- Urbanska, A. M., Bhatena, J., Martoni, C., Prakash, S. (2009).** Estimation of the potential antitumor activity of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* yogurt formulation in the attenuation of tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *Digestive Diseases and Sciences*,54, 264–273
- Vétizou, M., Daillère, R., Zitvogel, L. (2016).** Microbiote intestinal et réponses aux thérapies anti-tumorales. *médecine/sciences*, 32(11), 974-982.
- Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B. R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., Vuorela, P. M. (2003).** Studies on the toxicity of *Punica granatum L.* (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 295–300.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P., & Bassaganya-Riera, J. (2013).** Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006).** Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *The Journal of Dairy Research*, 73(4), 472.

Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654.

Valdigué P. (2000). Biochimie Clinique. Editions médicales internationale, France

Viguié, M., Fouéré, S., De La Salmonière, P., Rabian, C., Lebbe, C., Dubertret, L., Patrice, M., Herve, B., Bachelez, H. (2003). Peripheral blood lymphocyte subset counts in patients with dermatomyositis: clinical correlations and changes following therapy. *Medicine*, 82(2), 82-86.

Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P., Bassaganya-Riera, J. (2013). Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Wakefield, L. M., Hill, C. S. (2013). Beyond TGF β : roles of other TGF β superfamily members in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(5), 328-341.

Walter, J., & Ley, R. (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual review of microbiology*, 65, 411-429.

Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 489-499.

Waly, M. I., Ali, A., Guizani, N., Al-Rawahi, A. S., Farooq, S. A., Rahman, M. S. (2012). Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract efficacy as a dietary antioxidant against azoxymethane-induced colon cancer in rat. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(8), 4051-4055.

Walia, S., Kamal, R., Dhawan, D.K., Kanwar, S.S.(2018). Chemoprevention by Probiotics During 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinogenesis in Rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 63, 900–909.

Wang, D., Özen, C., Abu-Reidah, I. M., Chigurupati, S., Patra, J. K., Horbanczuk, J. O., Józwick, A., Tzvetkov, N.T., Uhrin, P., Atanasov, A. G.(2009). Vasculoprotective effects of pomegranate (*Punica granatum* L.), *Frontiers in pharmacology*, 9.

Wang, W., Hu, S. S., Kong, L. Z., Gao, R. L., Zhu, M. L., Wang, W. Y., Liu, M. B. (2014). Summary of report on cardiovascular diseases in China, 2012. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 27(7), 552.

Wang, Y. Wu, Y. Wang, Y. Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y., Li, W.(2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(521), 1-15.

Wang, D., Özen, C., Abu-Reidah, I. M., Chigurupati, S., Patra, J. K., Horbanczuk, J. O., Józwick, A., Tzvetkov, N. T., Uhrin, P., & Atanasov, A. G. (2018). Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Frontiers in pharmacology*, 9, 544.

WCRF, A. (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *AICR, Washington DC.*

Weinberg, R. A. (1996). How cancer arises. *Scientific American*, 275(3), 62-70.

Wild, C. (2014). *World cancer report 2014* (pp. 482-494). C. P. Wild, B. W. Stewart (Eds.). Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Williamson, G. (2017). The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition bulletin*, 42(3), 226-235.

Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D., Tso, P. (2003). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of nutrition*, 133(4), 1081-1087.

Wu, S., Shin, J., Zhang, G., Cohen, M., Franco, A., Sears, C.L. (2006). The *Bacteroides fragilis* toxin binds to a specific intestinal epithelial cell receptor. *Infection and Immunology*, 74(9) :5382-5482.

Wu, G., Chang, E. Y. (2003). Class-boundary alignment for imbalanced dataset learning. In *ICML 2003 workshop on learning from imbalanced data sets II, Washington*, pp. 49-56

Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119(4), 1557-1565.

Yadav, H., Jain, S., Sinha, P.R. (2008). Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* ameliorated the Streptozotocin-induced oxidative stress and dyslipidemia in rats. *Journal of Dairy Research*, 75:189–195.

Yang, M., Brackenbury, W. J. (2013). Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in physiology*, 4, 185.

Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., Mars, M. (2012). Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 40, 81-89.

Zhou, Q., Sherwin, R. P., Parrish, C., Richters, V., Groshen, S. G., Tsao-Wei, D., Markland, F. S. (2000). Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. *Breast cancer research and treatment*, 61(3), 249-259.

Zahin, M., Aqil, F., & Ahmad, I. (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(2), 99-107.

Zhang, S., Yang, J., Henning, S. M., Lee, R., Hsu, M., Grojean, E., Li, Z. (2017). Dietary pomegranate extract and inulin affect gut micro-biome differentially in mice fed an obesogenic diet. *Anaerobe*, 48 : 184–193.

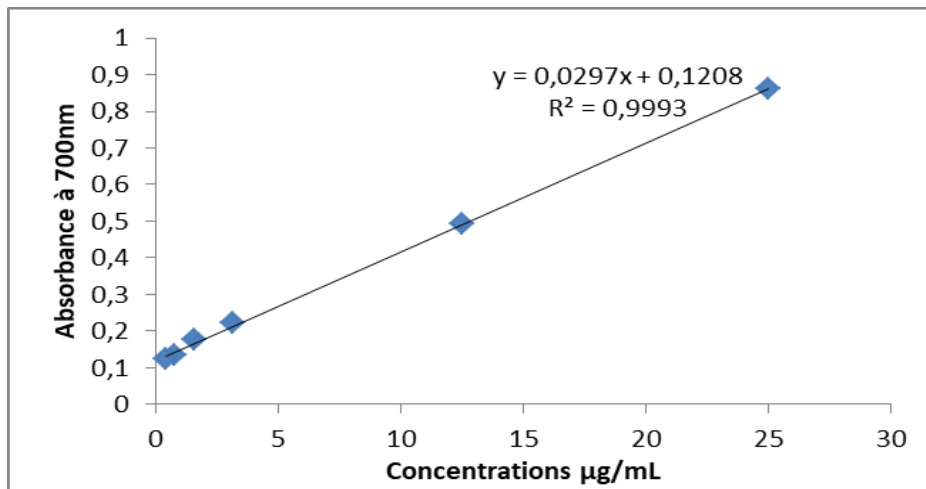
Ziar, H., Gérard, P., and Riazi, A. (2014). Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. *Journal of Science Food Agriculture*, 94(6): 1184-1190.

Zaki, S.A., Abdelatif, S.H., Abdelmohsen, N. R., Ismail, F.A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activities of pomegranate peels.*International Journal of Food Engineering.* 1, (2) :73-76.

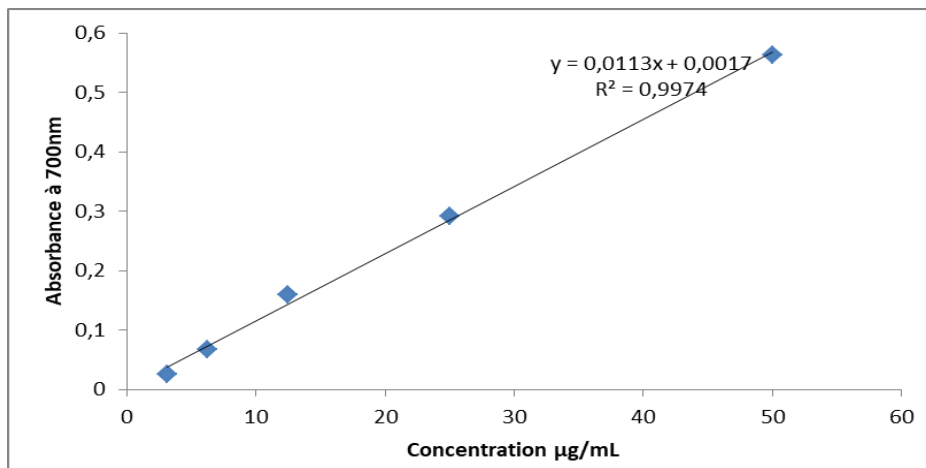
Zamani, B., Sheikhi, A., Namazi, N. Larijani, B. Azadbakht, L. (2019).The Effects of Supplementation with Probiotic on Biomarkers of Oxidative Stress in Adult Subjects: a Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(5) :1-11.

ANNEXES

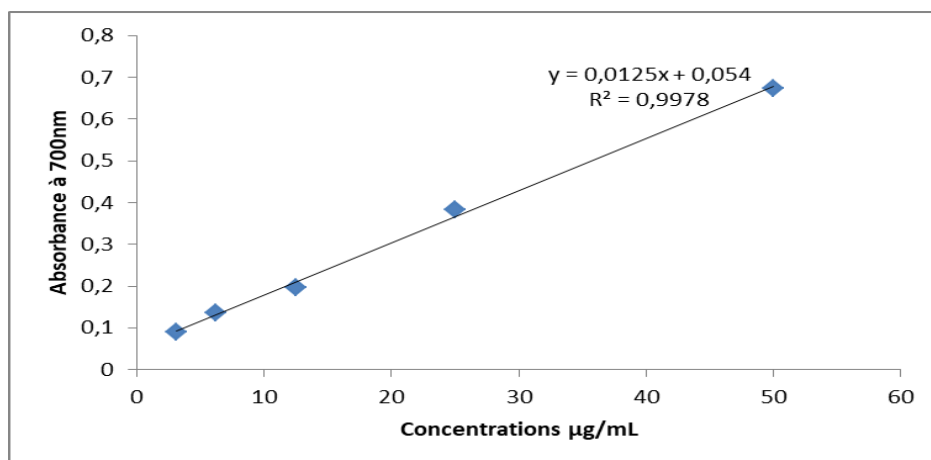
Annexe I. Courbes d'étalonnage pour l'activité antioxydante des extraits phénoliques d'écorce de grenade



Courbes d'étalonnage de l'acide gallique (µg/mL)

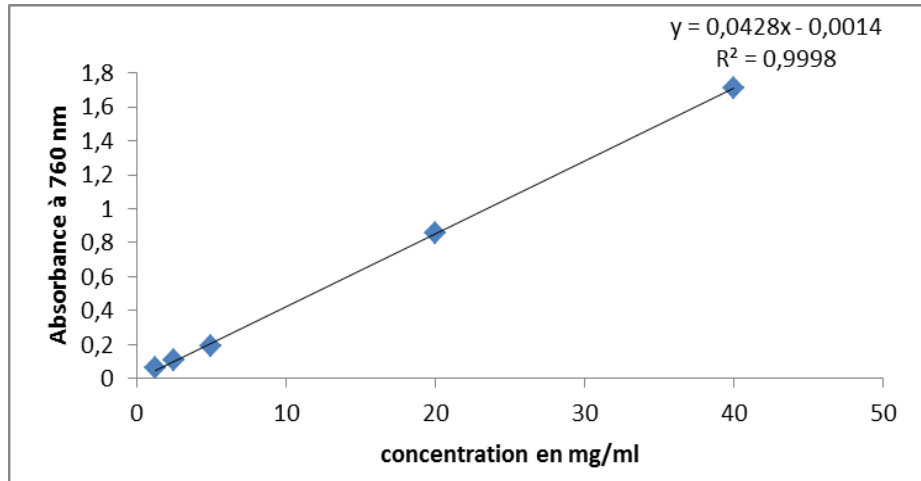


Courbes d'étalonnage de l'acide ascorbique (µg/mL)

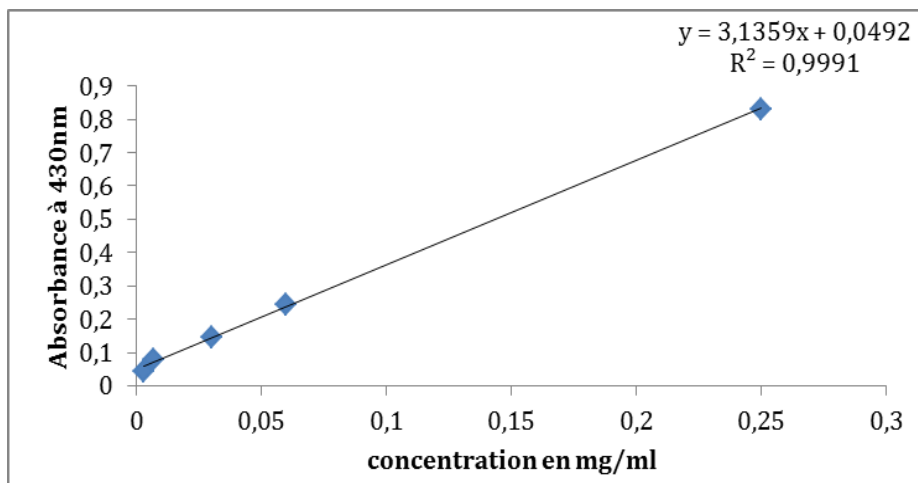


Courbes d'étalonnage de la quercétine (µg/mL)

Annexe II. Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques d'écorce de grenade



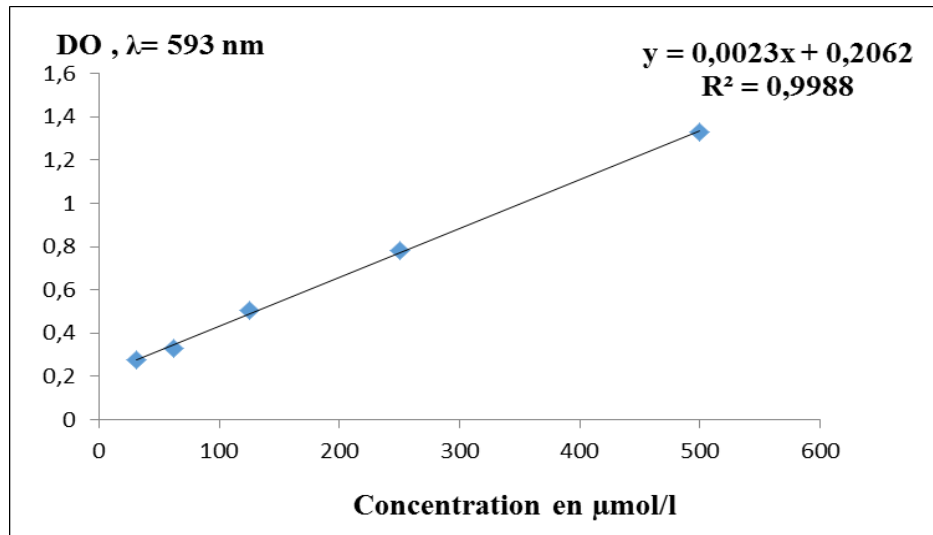
Courbe d'étalonnage de la quercétine (mg/mL)



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique mg/mL

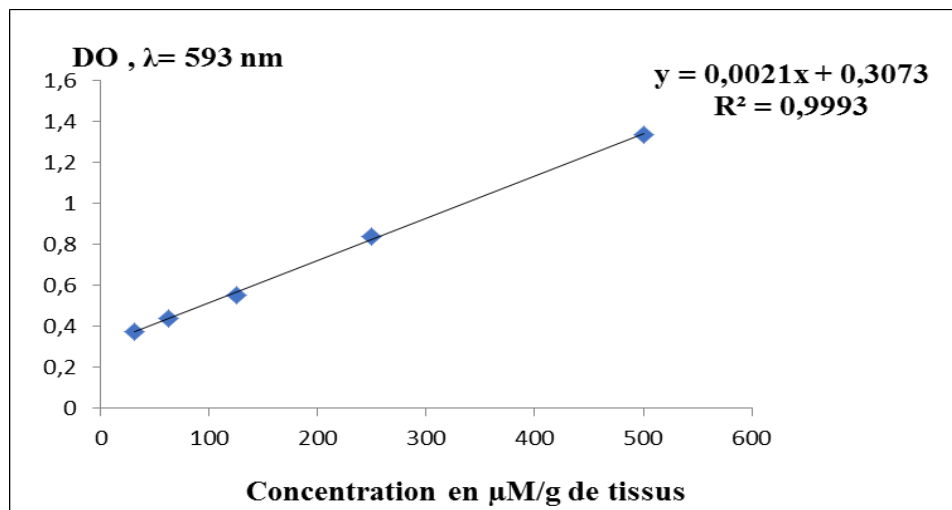
Annexe .III

1. Gamme d'étalonnage FRAP plasma



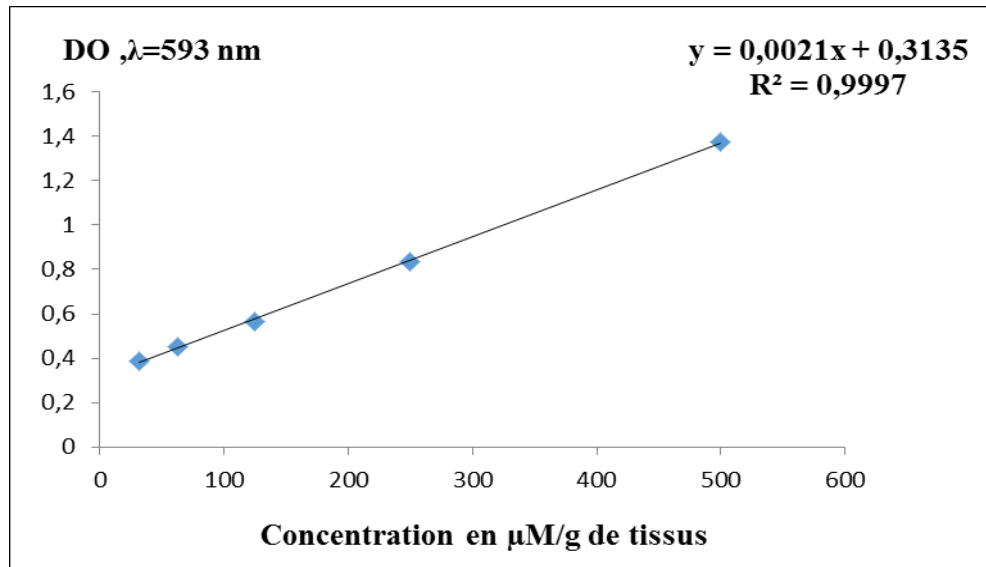
Courbe d'étalonnage de (FeSO_4)

2. Gamme d'étalonnage FRAP foie



Courbe d'étalonnage de FeSO_4

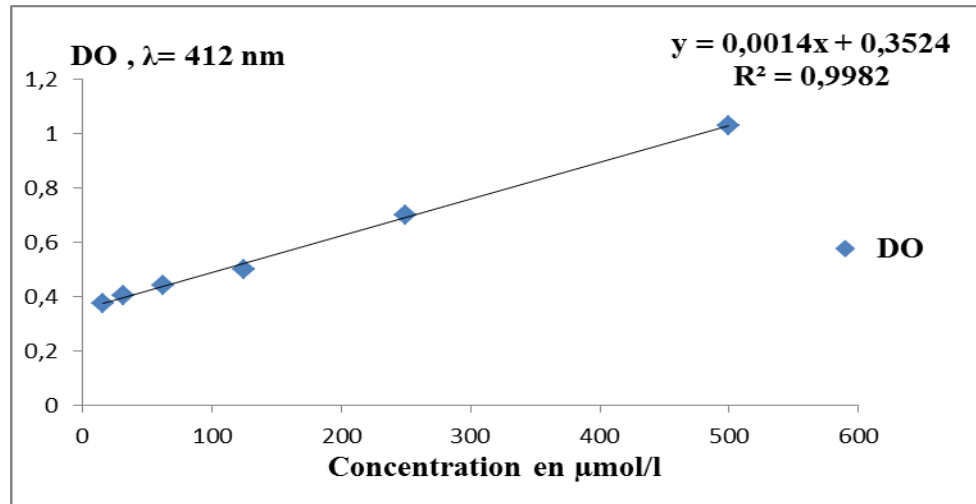
3. Gamme d'étalonnage FRAP colon



Courbe d'étalonnage de FeSO_4

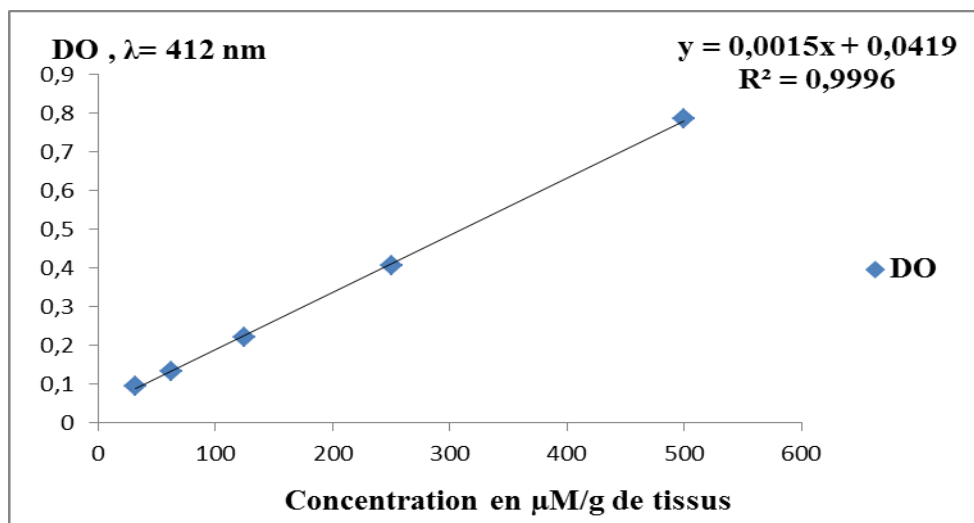
Annexe .IV

1. Gamme d'étalonnage Thiols plasma



Courbe d'étalonnage de NAC (N Acétyl Cystéine)

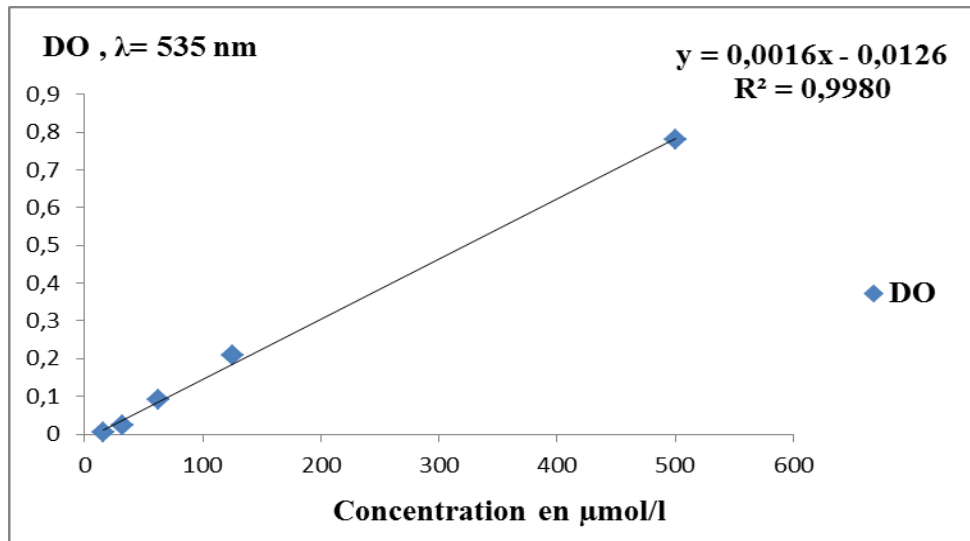
2. Gamme d'étalonnage Thiols foie



Courbe d'étalonnage de NAC

Annexe.V

Gamme d'étalonnage TBARS Plasma



Courbe d'étalonnage de MDA ($\mu\text{mol/L}$)

Annexe.VI

1. Milieu de Mueller-Hinton:

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caséine	17.5g
Amidon	1.5g
Gélose	17g

2. Composition du milieu Mac Conkey (Delarras, 2014)

Hydrolysate pancréatique de gélatine (bovine).....	20g
Lactose monohydraté bovine.....	20g
Bile désydratée (bovine).....	5g
Pourpre de bromocrésol.....	0.01g

3. Composition de Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) (Delarras, 2007)

Polypeptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait autolytique de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1.8g
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Sulfate de manganèse.....	0.02g

4. Composition du milieu BBE modifié (gélose bactéroïdes-bile-esculine)

Digestion pancréatique de caséine	14.5g
Digestion papaique de semoule de soja.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Esculine.....	1g
Citrate d'ammonium ferrique.....	0.5 g
Bile de bœuf.....	15g
Hémine.....	0.01g
Kanamycine.....	0.075g
Vitamine K1.....	0.01g
Gélose.....	14g

Coloration de Gram

- Déposer une goutte d'eau distillée sur une lame de verre. étaler la goutte et laisser sécher.
- Fixer par flambage à l'alcool 95°.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir une minute.
- Rincer rapidement à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.
- Recouvrir la lame de lugole et laisser agir une minute.
- Rincer à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.
- Différencier (décolorer) avec un mélange alcool/acétone .
- Rincer abondamment à l'eau du robinet.
- Recouvrir la lame de Fuchsine et laisser agir une minute.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Sécher puis observer au microscope (objectif × 100 à immersion).

Annexe.VII

Résultats d'identification de *Lactobacillus brevis* par la galerie Api50CH.



DOUBTFUL PROFILE

Strip Profile Note

API 50 CHL V5.1

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	45.2	0.59	AMY 99%	TUR 14%	GNT 85%	
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	37.3	0.5	RIB 16%	TRE 100%	AMD 100%	
Next taxon	% ID	T	Tests against			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides/dextranicum</i> 1	9.5	0.38	MAN 12%	MDG 100%	AMY 80%	TRE 100%
Complementary test(s)	GLUCOSEg	COCCI				
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-				
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	-	+				

Profil numérique d'identification de *Lactobacillus brevis*. par la galerie Api 50 CH

Annexe.VII

Résultats d'identification d'*E.coli* par la galerie Api20E



Résultat d'identification d'*E.coli* par la galerie Api20E

Profil numérique obtenu à l'aide du logiciel d'identification **apiweb**™

EXCELLENT IDENTIFICATION						
Strip	API 20 E V4.1					
Profile	5 1 4 4 5 5 2					
Significant taxa	% ID	T	Tests against			
<i>Escherichia coli</i> 1	99.9	1.0				
Next taxon	% ID	T	Tests against			
<i>Kluyvera</i> spp	.1	0.38	LDC 25%	SOR 25%	SAC 89%	AMY 99%



Zones d'inhibition induites par des extraits d'écorce de grenade vis-à-vis des différentes souches

PUBLICATIONS



Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel and Probiotics Modulate Oxidative Stress and Intestinal Microbiota Associated with Chemically Induced Colon Cancer in High-Fat-Diet Fed Rats

Rachida Benguiar¹, Rachida Benaraba², Houari Hemida³, Sarah Bouamar¹, Ali Riazi^{1*}

¹Laboratory of Beneficial Microorganisms, Functional Foods and Health, Department of Food Science, Faculty of Nature and Life Sciences, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, 27000 Algeria

²Laboratory of Improvement and Valorization of Local Animal Productions, Department of Nature and Life Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, Ibn Khaldoun University, Tiaret, 14000 Algeria

³Institute of Veterinary Science, Ibn Khaldoun University, Tiaret, 14000 Algeria

Corresponding Author: Ali Riazi, PhD, Professor, Laboratory of Beneficial Microorganisms, Functional Foods and Health, Department of Food Science, Faculty of Nature and Life Sciences, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, 27000 Algeria. Tel: +213-550 204365, Fax: +213-45 366501, Email: ardz22003@yahoo.fr

Received January 24, 2020; Accepted April 3, 2020; Online Published December 27, 2020

Abstract

Introduction: Colon cancer is a real public health problem. Pomegranate peel and probiotics are thought to be important therapeutic nutritional strategies for colon cancer prevention. The aim of this study was to evaluate the modulation effect of pomegranate peel alone or in combination with probiotics against the oxidative disorders and intestinal dysbiosis associated with chemically-induced precancerous lesions in rat colon.

Materials and Methods: Thirty-six male Wistar rats were divided into six groups: Groups 1 and 2 were negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (SD) for G1 and high-fat diet (HFD) for G2; while groups 3 and 4 were positive DMH-treated control receiving SD for G3 and HFD for G4; Groups 5 and 6 were DMH-treated and fed with 2.5% pomegranate peel-supplemented HFD diet in the presence of probiotics (4×10^9 CFU/kg diet) for G6. After 16 weeks of experimentation, biochemical analysis, oxidative parameters, histopathological examination of the colon and microbial analysis were performed.

Results: Findings showed that pomegranate peels and probiotics induced a significant increase in ferric reducing the ability of plasma levels by 67% and reduction in the malonaldehyde content by 66%. In addition, this treatment helped to improve the histological architecture of the colon in the rats of groups G5 and G6, in comparison with the HFD positive DMH-treated control group (G4). Furthermore, this treatment was also the most effective in decreasing the pathogenic bacteria amount involved in the intestinal dysbiosis (7 to 43%) and increasing in beneficial bacteria (60%).

Conclusions: These results suggest that pomegranate peel and probiotics act as a chemopreventive agent against preneoplastic lesions.

Keywords: *Punica granatum* L., Oxidative Stress, Intestinal Microbiota, Probiotics, Colon Cancer

Citation: Benguiar R, Benaraba R, Hemida H, Bouamar S, Riazi A. Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel and probiotics modulate oxidative stress and intestinal microbiota associated with chemically induced colon cancer in high-fat-diet fed rats. J Appl Biotechnol Rep. 2020;7(4):215-223. doi:10.30491/JABR.2020.121479.

Introduction

Colon cancer is the third most common cancer worldwide after lung and breast cancers.¹ Risks of this pathology are strongly linked to environmental, genetic and hormonal factors as well as lifestyle and type of diet. Moreover, it is generally accepted that a strong relationship may exist between colon cancer and dietary imbalance.² Therefore, many studies have suggested that type and amount of fat diet are associated with the risk of colon cancer.³⁻⁵ It has been clearly established that the excess dietary energy provided by high fat diet enhances the reactive oxygen species (ROS) production, thus causing oxidative stress which lead to DNA damage.⁶ Chemically-induced models of colon carcinogenesis in rats are adequate

for the study of induction and prevention of colon cancer. Actually, 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) is a colon specific carcinogen, it is metabolized in the liver by dehydrogenation to form metabolic intermediates such as azoxymethane and methylazoxymethanol. These metabolites give rise to methyl-carbonium ion which methylates DNA to generate oxidative stress and causes aberrant crypts foci.⁷ It is also involved in the dysbiosis of the intestinal microbiota which is associated with colon cancer. Increasing studies reveal that intestinal microbiota imbalance (dysbiosis) plays an important role in the etiology of colon cancer, through processes involving inflammation or mutagenic toxins.^{8,9} Some experimental and clinical evidence suggest that probiotics, prebiotics or

their combinations (synbiotics) modulate the gut microbiota composition and contribute to protective effects against colon cancer progression.^{10,11} Probiotics are viable microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host.¹² The dietary supplements of lactic acid bacteria as a preventive of colon cancer have received special attention. Prebiotics are substrate that selectively stimulate the growth of beneficial bacteria in colon conferring a health benefit.¹³

Colon cancer is usually associated with persistent oxidative stress and ROS which react with DNA, lipids and cellular proteins. Thus, the ROS attack leads to lipide peroxidation, and genetic alteration to contribute carcinogenesis.¹⁴ Therefore, the organism possess endogenous antioxidant defense system against these ROS damaging such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase, catalase, glutathione (GSH) and vitamins.

The modulation of oxidative stress by natural antioxidant compounds is currently an efficient approach in colon cancer prevention. Consequently, pomegranate polyphenols could be considered as promising candidates for colon cancer chemoprevention.

The pomegranate (*Punica granatum* L.) is a fruit which has been widely studied due to its bioactive compounds and its remarkable therapeutic properties.¹⁵ The consumption of this fruit generates considerable quantities of by-products, indeed, pomegranate peels are frequently rejected without recovery. As a result, pomegranate peel contains important phytochemical compounds such as tannins and anthocyanins.¹⁶ These bioactive compounds possess different biological activities such as scavenging of free radicals, inhibiting microbial growth and reducing the risk of cardiovascular, cerebrovascular diseases and certain cancers.^{15,17} They can also have antimicrobial effects that may influence the composition of the intestinal microbiota. Furthermore, Li et al¹⁸ reported that pomegranate ellagitannin promote the growth of beneficial bacteria such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* and inhibit the growth of *Bacteroides*, clostridia, and Enterobacteriaceae in in vitro studies. However, there has been no studies evaluating the combined effect of pomegranate peel and probiotics on precancerous colonic lesions prevention by modulating both oxidative stress and intestinal dysbiosis. In this context, this study aimed to evaluate the chemopreventive effects of pomegranate peel separately or combined with probiotics, against alterations in the intestinal microbiota and oxidative stress associated with DMH-induced colon cancer in high-fat-diet fed Wistar rats.

Materials and Methods

Chemicals

To carry out this study, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH), tripyridyl-s-triazine (TPTZ), N-acetylcysteine (NAC), 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), thiobarbituric acid (TBA), 1,1, 3, 3-tetraethoxypropane (TEP) and trichloroacetic acid (TCA), were purchased from Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA. All other chemicals used in this study were of high quality.

Plant Material

The pomegranate (*P. granatum* L.) fruit used in this study is known as "Séfri"; which comes from the region of Mostaganem (northwestern Algeria). The pomegranate peels were dried in dark at room temperature, then ground with a mechanical grinder (Pulverisette, Fritsch, Germany).

Probiotics

Lactibiane Tolérance® (PiLeJe, Package Reference 14BX4 06-2016, France) is a dietary supplement containing 4×10^9 CFU/g of lyophilized viable lactic acid bacteria. It is composed of five bacterial strains, namely *Bifidobacterium lactis* LA 303, *Lactobacillus acidophilus* LA 201, *Lactobacillus plantarum* LA 301, *Lactobacillus salivarius* LA 302 and *Bifidobacterium lactis* LA 304.

Animals, Diets and Experimental Design

Thirty-six adult male Wistar rats (231.9 ± 6.76 g) were obtained from the Pasteur Institute in Algiers (Algeria). All rats were given a standard commercial diet (8.05% fat, 45.36% carbohydrates, and 19.07% proteins: 330.21 kcal/100 g) which purchased from the National Office of Livestock Feed (Rahwiya, Tiaret, Algeria). Rats were kept for 2 weeks in an air-conditioned room at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and $55 \pm 10\%$ relative humidity with a standard 12-hour light-dark cycle in order to stabilize all metabolic conditions. All the experiments were carried out according to the guidelines of the Institutional Animal Care Committee of the Algerian Higher Education and Scientific Research (Agreement Number 45/DGLPAG/DVA.SDA.14).

Specific diet namely high-fat diet (HFD) containing 48% animal fat of ovine origin, 6.1% carbohydrates and 20% proteins (591.93 kcal/100 g) was also used in the present trial protocol. The DMH (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was administered by subcutaneous injection at 30 mg/kg body weight (b.w.), once a week, for a period of 9 weeks. Animal weights were checked twice a week. After this acclimation period, these rats were divided into 6 groups (6 rats per group) as shown in Table 1.

The animals were anesthetized and sacrificed after 16 weeks of experiment. Blood samples were collected through cardiac puncture. The plasma was then recovered for the determination of biochemical and oxidative parameters.

Table 1. Animal Experimental Design

Groups	Treatments
G1	Fed a standard diet
G2	Fed a High fat diet (HFD) + saline solution injection (0.9%)
G3	Fed a standard diet + DMH subcutaneous injection (30 mg/kg body weight, once a week for 9 weeks)
G4	Fed a HFD + DMH subcutaneous injections (30 mg/kg b.w. once a week for 9 weeks)
G5	DMH subcutaneous injections (30 mg/kg b.w. once a week for 9 weeks) + Fed a HFD supplemented with pomegranate peel (2.5 g/100 g diet)
G6	DMH subcutaneous injections (30 mg/kg b.w. once a week for 9 weeks) + Fed a HFD+2.5% (w/w) pomegranate peel and probiotics Lactibiane Tolérance® (4×10^9 CFU/kg diet)

Biochemical Parameters Determination

Total cholesterol (Chol), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine Aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were assayed by colorimetric and enzymatic methods (Spinreact, Sant Esteve De Bas, Spain) according to Durand and Beaudeau.¹⁹

Measurement of the Ferric Reducing Ability of Plasma

The total plasma reducing power was evaluated using the technique described by Benzi and Strain.²⁰ This method was developed using TPTZ reagent (Sigma Aldrich, Germany). A standard curve was obtained from a stock solution of FeSO₄·7H₂O at 1 mM. Then, 100 µL of the sample solution were added to 900 µL of ferric reducing ability of plasma (FRAP) solution. Afterwards, the absorbance readings of the samples were performed by spectrometry at 593 nm, after 30 minutes of incubation at 37°C.

Protein Oxidation Assay - Thiol Groups

The oxidation of proteins was determined according to the method of Faure and Lafond²¹ by measuring the thiol groups in the plasma. The standard curve was obtained using a solution of NAC (1 mM). Then, a sample of 250 µL was added to 750 µL of phosphate buffer (pH=8) and 250 µL of DTNB (Sigma Aldrich, Germany). The mixture was left in the dark for 15 minutes, then, the absorbance was read at 412 nm.

Evaluation of Lipid Peroxidation

This assay was performed on plasma. To do so, 800 µL of a mixture TBA at 0.375% (w/v), TCA (20%), BHT (0.01%) and hydrogen chloride (HCl) 1N were added to 200 µL of the sample solution. After stirring for 2 minutes, the mixture was incubated in a water bath at 100°C for 15 minutes. To stop the reaction, the tubes were placed in ice, and the complex thus obtained was extracted with butanol during 2 minutes. After centrifugation at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C (Sigma, 3K10, Laborzentrifugen, Germany), the supernatant was taken and the absorbance of the pink chromogen obtained was measured at 532 nm using UV/visible light spectrophotometer (Shimadzu 1240, Japan). In addition, the plasma malondialdehyde (MDA) concentration was calculated using a standard curve of TEP.²²

Histopathological Analysis

The colons were removed, and were then rinsed with 0.9% NaCl solution. Next, the colons were opened longitudinally and placed on filter paper strips, and directly fixed in 10% formalin for 24 hours and then dehydrated in ascending concentrations of ethanol. After dehydration, the specimens were cleared in xylene and then embedded in paraffin. Some paraffin tissue blocks were cut into microscopic sections of thickness 5 microns using a microtome (Leika RM2145, Germany). The obtained tissue sections were collected and placed on glass slides, which were stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination using a light microscope (Zeiss, Germany) according to Bancroft and Gamble.²³

Microbiological Analysis

To assess the effect of pomegranate peel and probiotics on the intestinal microbiota composition, some faecal bacteria were enumerated such as *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Bacteroides* spp. This method consists in dissolving 1g of fresh feces in 9 mL of 0.9% physiological saline solution. Ten-fold dilutions were prepared in the same diluent. Then, 0.1 mL of the diluted aliquot sample was spread on the surface of MacConkey agar for *E. coli*. All plates were incubated at 37°C for 24 hours.²⁴ This is while the enumeration of *Bacteroides*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was realized by pour plate method using Bacteroides Bile Esculin (BBE) agar + kanamycin, MRS agar and MRS + 0.5% cysteine-HCl, respectively and the incubation was realized under anaerobic conditions using the GasPak (AnaeroGen™, Oxoid, Basingstoke, UK) at 37°C for 48 to 72 hours. The viable counts were expressed as the log₁₀ of colony forming units (CFU/g) of faeces.

Statistical Analyses

All the obtained results are presented in the form of means ± standard error of three determinations in triplicate. The statistical analysis of data was achieved using the STATISTICA software (version 6.1, StatSoft, Tulsa, OK, USA). Statistical comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc Tukey's test.

A value of $P < 0.05$ was used as the significance threshold.

Results

Effect of Pomegranate Peel Combined or not with Probiotics on Weight Gain and Energy Intake

The results showed a significant difference ($P < 0.01$) between the weight gain of the HFD groups (G2 and G4) and the control groups (G1 and G3). However, treatment of rats with pomegranate peel combined or not with probiotics decreased the weight gain by 26% and 28%, in animals from the G5 and G6 groups, respectively, in comparison to the HFD + DMH positive control group (G4). Similarly, a significant ($P < 0.01$) difference in energy intake was also noted between G5 (328.72 ± 9.23 kcal) and G6 (327.08 ± 25.02 kcal) respectively compared to G4 (408.6 ± 12.5 kcal). Results are shown in Figure 1.

Effect of Pomegranate Peel Alone or in Combination with Probiotics on the Biochemical Parameters

Dietary supplementation with pomegranate peel combined or not with probiotics, induced variations in the biochemical parameters. Results obtained with rats of G5 (HFD-Peel + DMH) and G6 (HFD-Peel-Probiotics + DMH) groups, indicated a significant decrease ($P < 0.001$) in cholesterol levels of 36% and 40%, and LDL-C levels of 48% and 64%, respectively, in comparison with rats of G4 (HFD + DMH) positive control group. Furthermore triglyceride contents significantly ($P < 0.05$) decreased in the G5 (26%) and G6 (29%) groups of rats as clearly shown in Table 1. The results also showed a very significant decrease ($P < 0.01$) in the plasma content of ASAT and ALAT in HFD-Peel + DMH and HFD-Peel-Probiotics + DMH groups in comparison with the

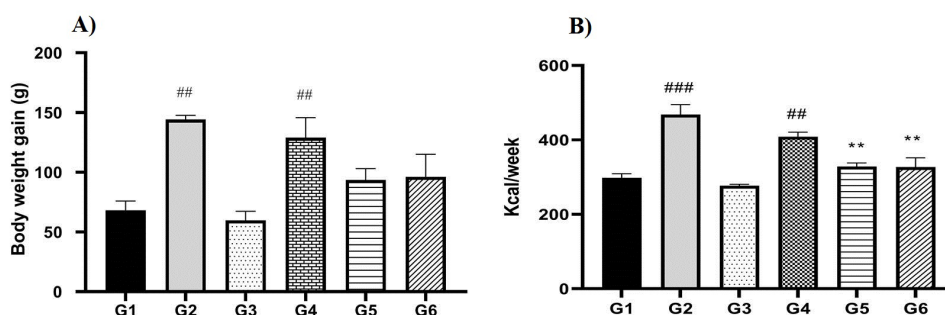


Figure 1. Effect of Pomegranate Peel Alone or Combined With Probiotics on (A) Body Weight Gain (g); (B) Energy Intake (kcal/wk) of Different Groups of Rats After 16 Weeks of Experiment.

The results are expressed as means \pm SE (n = 6). G1: negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (SD); G2: negative DMH-untreated control rats receiving high-fat diet (HFD); G3: positive DMH-treated control rats receiving SD; G4: positive DMH-treated control rats receiving HFD; G5 and G6 are DMH-treated and fed with 2.5% (w/w) powdered pomegranate peel-supplemented HFD diet in the presence of a mixture of probiotics for G6 only. ^{###} $P < 0.001$ and ^{**} $P < 0.01$ significant difference compared to negative DMH-untreated control group (G1). [#] $P < 0.01$ Significant difference compared to G4.

HFD + DMH group (Table 2).

Effect of Pomegranate Peel and Probiotics on the Oxidative Parameters

Ferric Reducing Ability of Plasma

The results showed that the FRAP in rats of the two groups (G3 and G4), i.e. positive DMH-treated controls (SD and HFD) groups, was significantly lower ($P < 0.01$) compared with that of the negative DMH-untreated control (SD and HFD) rat groups (G1 and G2). On the other hand, the incorporation of pomegranate peel into these experimental diets, supplemented or not with probiotics (G5 and G6) had a significant ($P < 0.001$) impact on the FRAP content. Indeed, there was a significant increase in FRAP ($P < 0.001$), which is estimated at 88% in the G5 (HFD-Peel + DMH) group, in comparison to the HFD positive DMH-treated control group (Figure 2a).

Evaluation of Plasma Protein Oxidation (SH Groups)

The evaluation of protein oxidation indicated that the supplementation of experimental diets (HFD) with pomegranate peel combined or not with probiotics induced

a very significant increase of 67 and 75% ($P < 0.001$) in SH groups in the G5 (HFD-Peel + DMH) and G6 (HFD-Peel Probiotics DMH), respectively, in comparison with the HFD positive DMH-treated control group (G4) as reported in Figure 2b.

Plasma Lipid Peroxidation (Malondialdehyde Level)

The results of lipid peroxidation evaluation are shown in Figure 3. They indicated that DMH-treatment induced a significant increase ($P < 0.001$) in plasma MDA concentrations in rat fed with a standard diet (G1) or with a high fat (G2) diet. These concentrations were very different from those recorded in negative DMH-untreated control (SD and HFD) groups (G1 and G2). However, high significant reduction ($P < 0.001$) in MDA levels was observed in G5 (HFD-Peel + DMH) (55%). Similarly, the administration of probiotic decreased the MDA level (66%) in comparison with HFD positive DMH-treated control group (G4).

Histopathological Study

Histopathological examination of colons from negative DMH-untreated control rats (G1 and G2 groups), exhibited a

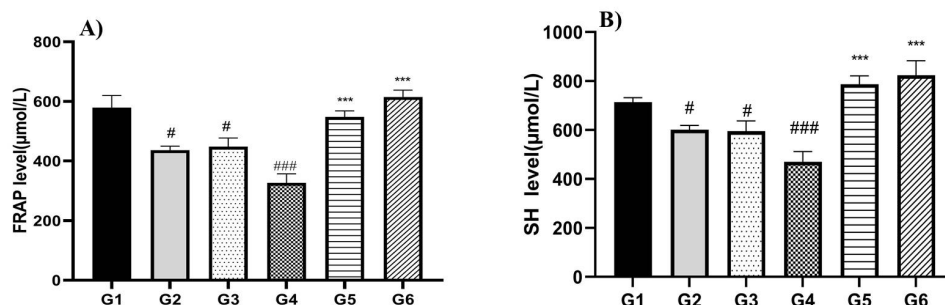


Figure 2. Effect of Pomegranate Peel Alone or in Combination With Probiotics on (A) FRAP Level ($\mu\text{mol/L}$) and (B) Thiol Groups Level in Plasma of the Different Groups of Rats After 16 Weeks.

The results are expressed as means \pm SE (n = 6). G1: negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (SD); G2: negative DMH-untreated control rats receiving high-fat diet (HFD); G3: positive DMH-treated control rats receiving SD; G4: positive DMH-treated control rats receiving HFD; G5 and G6 are DMH-treated and fed with 2.5% (w/w) powdered pomegranate peel-supplemented HFD diet in the presence of a mixture of probiotics for G6 only. ^{###} $P < 0.001$ and [#] $P < 0.05$ significant difference compared to negative DMH-untreated control group (G1). ^{***} $P < 0.001$ Significant difference compared to G4. Abbreviations: FRAP, ferric reducing ability of Plasma; SH, Sulfhydryl group.

Table 2. Plasma Cholesterol, Triglyceride, HDL-C, LDL-C, AST and ALT Levels in Different Rat Groups After 16 Weeks of Experiment

Groups	Chol (g/L)	LDL (g/L)	HDL-C (g/L)	TG (g/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
G1	0.53±0.11	0.16±0.44	0.53±0.55	0.52±0.06	119±6.61	57.37±2.88
G2	1.45±0.3 ^{***}	0.29±0.01 ^{**}	0.63±0.09	0.99±0.13 ^{**}	143±17.82 [‡]	91.78±2.89 ^{**}
G3	0.84±0.06	0.17±0.02	0.63±0.01	1.14±0.05 ^{***}	118.57±11	88.09±9.02 ^{**}
G4	1.07±0.1 ^{**}	0.25±0.04	0.53±0.05	1.08±0.08 ^{***}	145.38±10.47 [‡]	107.34±12.9 ^{**}
G5	0.68±0.03 [*]	0.13±0.03 ^{**}	0.62±0.06	0.76±0.15 [*]	110.71±5.65 ^{**}	55.05±2.24 ^{***}
G6	0.74±0.06 [*]	0.09±0.03 ^{**}	0.56±0.03	0.85±0.09 [*]	111.25±5.20 ^{**}	61.88±1.23 ^{***}

Abbreviations: CHL: Cholesterol; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; TG: triglyceride; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase.

The results are expressed as means ± SE (n = 6). G1: negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (SD); G2: negative DMH-untreated control rats receiving high-fat diet (HFD); G3: positive DMH-treated control rats receiving SD; G4: positive DMH-treated control rats receiving HFD; G5 and G6 are DMH-treated and fed with 2.5% (w/w) pomegranate peel and supplemented HFD diet in the presence of probiotics for G6 only.

^{***}P<0.001, ^{**}P<0.01 and [‡]P<0.05 significant difference compared to G1.

^{***}P<0.001, ^{**}P<0.01 and [‡]P<0.05 significant difference compared to G4.

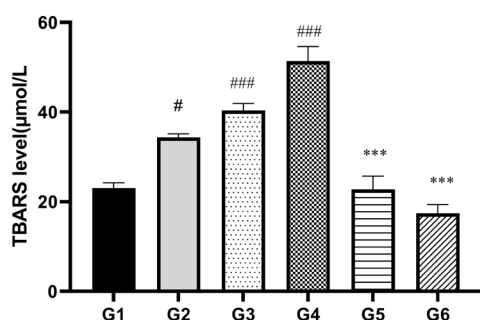


Figure 3. Effect of Pomegranate Peel Alone or in Combination With Probiotics on Plasma Lipid Peroxidation (µmol/L) Levels in Different Groups of Rats After 16 Weeks.

The results are expressed as means ± SE (n = 6). G1: negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (SD); G2: negative DMH-untreated control rats receiving high-fat diet (HFD); G3: positive DMH-treated control rats receiving SD; G4: positive DMH-treated control rats receiving HFD; G5 and G6 are DMH-treated and fed with 2.5% (w/w) powdered pomegranate peel-supplemented HFD diet in the presence of a mixture of probiotics for G6 only. ^{***}P<0.001 and [‡]P<0.05 significant difference compared to negative DMH-untreated control group (G1). ^{***}P<0.001 significant difference compared to G4. Abbreviation: TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

homogeneous histological architecture, with a normal colonic mucosa, consisting of glands of homogeneous structure (Figure 4A-B). However, the HFD positive DMH-treated control group (G4) revealed either intra-mucosal carcinoma or high-grade dysplasia (Figure 4D). This dysplasia was characterized by disorganized crypt architecture, nuclear stratification reaching the apical side of cells, loss of mucosecretion and presence of mitotic figures. Moreover, in some rats belonging to the group G5 (HFD-Peel + DMH) (see Figure 4E), colons exhibited low-grade dysplasia, in comparison with those in group G4. However, in the last group (G6) (HFD-Peel-Probiotics + DMH), the incorporation of pomegranate peel and probiotics in the diet allows restoring the normal histological appearance of the colonic mucosa, which exhibited a homogenous gland structure, in comparison with rats in group G4, as seen in Figure 4F.

Microbial Analysis

The results revealed a highly significant decrease ($P<0.001$) in the number of *E. coli* (58%) and *Bacteroides* spp. (42%) in HFD diet supplemented with pomegranate peel group (G5) in comparison to the HFD positive DMH-treated control group (G4). Similarly, during this experiment, a 60 and 58% reduction in the count of *E.coli* and *Bacteroides* spp., respectively, was observed after the administration of probiotics in G6, as compared with the G4 (Figure 5). On the other side, the highest count ($11.87 \pm 0.25 \log_{10}$ CFU/g ; $P<0.001$) of *Lactobacillus* spp. was detected in the G5 group as compared with that of the G4 ($6.48 \pm 0.05 \log_{10}$ CFU/g). Moreover, the diet supplemented with pomegranate peel led to a highly significant ($P<0.001$) increase in the amount of *Bifidobacterium*, which is estimated at 52% in the group fed the HFDP diet (G5), as compared with those of G4. In addition, the incorporation of probiotics in a high-fat diet (G6) induced an increase in the counts of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which is estimated at 7% and 43%, respectively, in comparison to HFD positive DMH-treated control group (G4), as shown in Figure 6.

Discussion

The current study was done to assess the effect of a combined treatment of pomegranate peel powder and probiotics on rat colon carcinogenesis. The administration of the pomegranate peel to a high fat diet combined or not with probiotics induced a reduction in the levels of plasma biochemical parameters. Thus, these results are in agreement with those reported by Hossin²⁵ who confirmed that pomegranate peel improved the plasma lipid profile and significantly reduced triglyceride, total cholesterol and LDL-cholesterol contents in rats fed with a high-fat diet. This decrease may be due to the beneficial effect of the bioactive compounds, i.e. polyphenols and dietary fiber, of pomegranate peels. The results of the present support previous studies that the administration of probiotics lead to a decrease in plasma cholesterol levels in rats subjected to a HFD diet.²⁶ In addition, polyphenols could modify the number and type of bacteria that constitute the intestinal microflora, which use these bioactive molecules to produce different secondary metabolites such as dihydroxyphenyl acid, phenylpropionic acid, and urolithin.^{16,27} These metabolites are

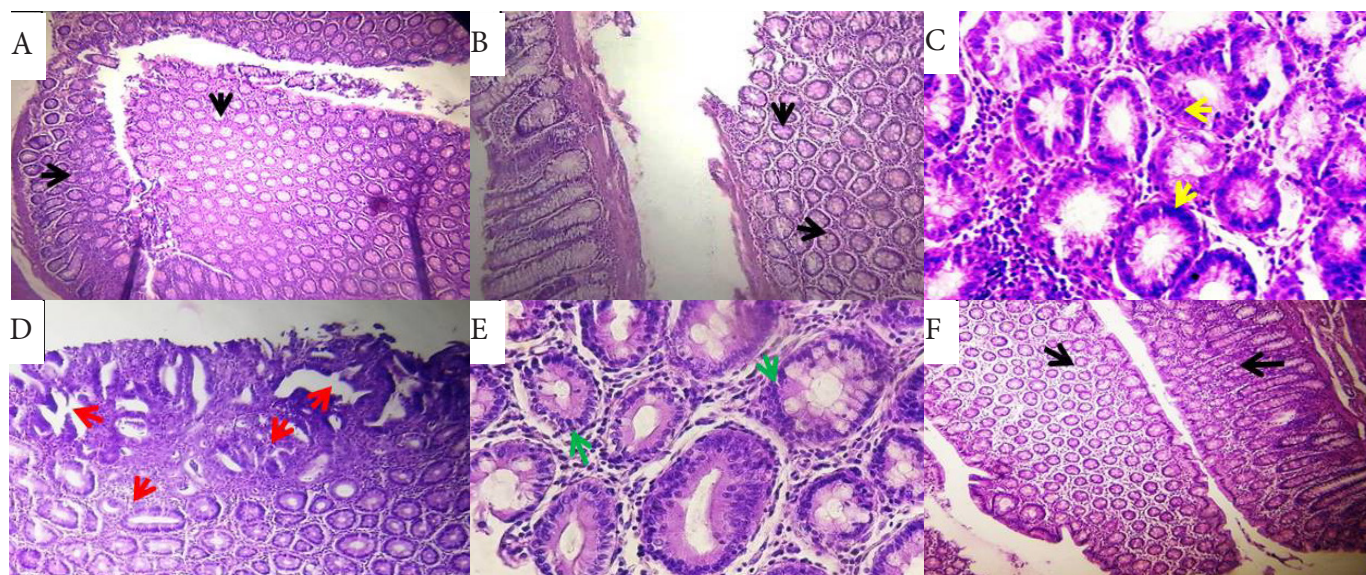


Figure 4. Photomicrographs of Histological Sections of Rats Colon After 16 Weeks of Treatment. Histological sections of normal colon from (black arrow) (A) negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (G1) negative DMH-untreated control rats receiving HFD (G2) (H&E,10×); (C) A microscopic section of colon from positive DMH-treated control rats receiving SD (G3) shows a high-grade dysplasia (yellow arrow) (H&E,40×), (D) Histological sections of colon from positive DMH-treated control rats receiving HFD (G4) represents an intramucosal carcinoma (red arrow) (H&E, 10×); (E) A microscopic section of colon from DMH-treated rats and fed with 2.5% (w/w) powdered pomegranate peel-supplemented HFD (G5); demonstrates a low grade dysplasia (green arrow) (H&E, 40×), (F) Histological section of colon from HFD-Peel-Probiotics + DMH group (G6) (black arrow) (H&E, 10×).

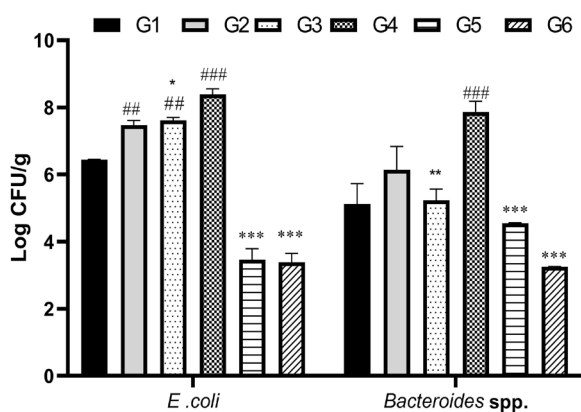


Figure 5. Influence of Pomegranate Peel Combined or Not With Probiotics on the Number of *E. coli* and *Bacteroides* spp. The results are expressed as means ± SE (n = 6). G1: negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (SD); G2: negative DMH-untreated control rats receiving high-fat diet (HFD); G3: positive DMH-treated control rats receiving SD; G4: positive DMH-treated control rats receiving HFD. G5 and G6 are DMH-treated and fed with 2.5% (w/w) powdered pomegranate peel-supplemented HFD diet in the presence of a mixture of probiotics for G6 only. ^{###}*P*<0.001 and ^{**}*P*<0.01 significant difference compared to negative DMH-untreated control group (G1). ^{***}*P*<0.001, ^{**}*P*<0.01 and ^{*}*P*<0.05 significant difference compared to G4. Abbreviation: CFU, colony forming unit.

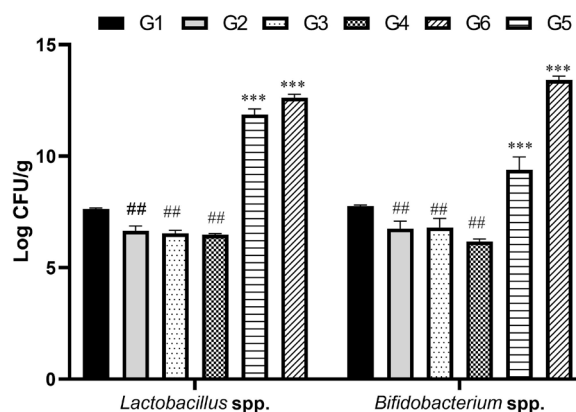


Figure 6. Influence of Pomegranate Peel Combined or Not With Probiotics on the Number of *Lactobacillus* spp., and *Bifidobacterium* spp. in Rats During the 16 Weeks of Treatment. The results are expressed as means ± SE (n = 6). G1: negative DMH-untreated control rats receiving standard diet (SD); G2: negative DMH-untreated control rats receiving high-fat diet (HFD); G3: positive DMH-treated control rats receiving SD; G4: positive DMH-treated control rats receiving HFD. G5 and G6 are DMH-treated and fed with 2.5% (w/w) powdered pomegranate peel-supplemented HFD diet in the presence of a mixture of probiotics for G6 only. ^{###}*P*<0.001 and ^{**}*P*<0.01 significant difference compared to negative DMH-untreated control group (G1). ^{***}*P*<0.001 significant difference compared to G4. Abbreviation: CFU, colony forming unit

easily absorbed by the intestine and have greater antioxidant and anti-inflammatory activities than the polyphenols that generated them.²⁸ These secondary derivatives are able to influence the lipid metabolism by promoting their excretion in feces, and thereby lowering the plasma cholesterol levels in hypercholesterolemic rats.²⁹ Results also showed a decrease in plasma transaminase (AST and ALT) levels in the HFD-Peel-Probiotics + DMH group as compared with those in the HFD positive DMH-treated control group. These results are consistent with those obtained by Sadeghipour et al³⁰ who indicated that pomegranate peel ethanolic extract reduce the AST and ALT plasma levels in Wistar rats fed with a lipid-enriched diet.

The results of the oxidative parameters are consistent with those reported by Perše and Cerar³¹ who established that the hyperlipidic diet in DMH-treated rats decreased the total plasma antioxidant defense capacity, resulting in a change in the oxidative status. Indeed, a study claimed that chemically induced colon cancer in experimental models caused not only excessive production of free radicals, but also a decrease in antioxidant defense capacities due to the decreased activity of certain antioxidant enzymes.³² This disorder in the oxidant/antioxidant balance could be related to the secondary metabolite, resulting from DMH metabolic activation in the liver and colon by intestinal microflora.³³ It was also reported that HFD supplemented with pomegranate peel and probiotics enhanced the protection against the protein thiol oxidation and lipid peroxidation. Recently, Salwe et al³⁴ suggested that pomegranate peel has a powerful antioxidant power due to its polyphenols and flavonoids, such as the ellagic acid and punicalagin which have the capacity to decrease the lipids peroxidation. It is now well established that there is a close link between the inflammatory status and oxidative stress during the development of colon cancer.³⁵ This observation could explain the antioxidant effect of pomegranate peel polyphenols, via their anti-inflammatory activity as previously demonstrated by Larrosa et al³⁶ who revealed that ellagic acid had an antiproliferative effect, which resulted in G1 cell-cycle arrest and in the induction of apoptosis as well. Besides, this experiment suggested that administration of pomegranate peel and probiotics allows restoring the normal histological appearance of the colon, which confirmed the absence of tumor and the disappearance of signs of dysplasia in colonic crypts. Protection against the development of colon carcinogenesis using pomegranate peel can be explained by its pro-apoptotic potential. Recently, an experimental study has revealed that pomegranate peel extracts induce apoptosis, reduce inflammation and therefore inhibit the proliferation of tumor cells.³⁷ Furthermore, it has been widely established that probiotics had an impact on immune and cellular responses through various mechanisms involving the strengthening of the epithelial barrier, and the stimulation of anti-inflammatory parameters, antioxidant and anti-carcinogenic compounds.^{24,38} Some probiotic strains, such as *Lactobacilli*, can exert an immunomodulatory effect through the induction of regulatory activity of T lymphocytes, and stimulation of the phagocytic and bactericidal activities of neutrophils and the natural killer cell activity which is involved in the suppression

of tumorigenesis.³⁹ On the other hand, Urbanska et al⁴⁰ reported that the possible immunomodulatory property of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* is closely linked to reduced risks of intestinal tumors, dysplasia and inflammation. The mechanism involved in this phenomenon is related to the dysfunction of protein kinase activity which is regulated by extracellular signals.

Moreover, probiotic strains can modulate the profile of the intestinal microbiota whose composition variation are widely involved in colonic carcinogenesis. In this study, dietary supplementation with pomegranate peel and probiotics had an influence on the microbial profile of the intestinal microflora of DMH-treated rats; this is confirmed by the decrease in the number of *E. coli* in animals of this group. This decrease is revealed in the beneficial effect of bioactive compounds, such as polyphenols and dietary fibers, contained in pomegranate peel. It is clearly established that polyphenols can modify the microbiota composition by restoring it via its antibacterial and prebiotic effect.⁴¹ Reddy et al⁴² suggested that punicalagins of pomegranate peel exert antimicrobial activity by inhibiting the growth of many pathogenic bacteria, essentially *E. coli*, which is a bacterium that has the capacity to produce colibactin toxin. This toxin is characterized by a clastogenic potential and it causes double-strand breaks of DNA in intestinal cells, thus triggering a chromosomal instability which can turn healthy cells into cancer cells.⁴³ Furtherly, Bialonska et al⁴⁴ reported that pomegranate polyphenols (ellagitannins) inhibit the growth of *Bacteroides fragilis* in a dose-response relationship. This antimicrobial activity can be explained by the intestinal luminal pH decrease caused by polyphenols, which significantly affect the intestinal profile. Moreover, other studies showed that high dietary fiber intake caused a large production of short chain fatty acids, which are capable of decreasing the intestinal pH which prevented the growth of potentially pathogenic bacteria, such as *E. coli* and other bacteria of the family *Enterobacteriaceae*.⁴⁵

This study indicated that powder of pomegranate peel significantly increased the amount of *Lactobacillus* spp. in the fecal samples of DMH-treated rats. This increase can be explained by the combination of two effects; the first one is related to the fact that pomegranate peel selectively stimulates *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. through the prebiotic activity⁴¹; while the second one is related to the beneficial nature of probiotic bacteria. These findings corroborate those reported by Thirabunyanon and Hongwittayakorn⁴⁶ who established that *Lactobacillus salivarius*, has antiproliferative properties by adhering directly to colon cancer cells, thus triggering the production of butyric acid and other short chain fatty acids.

Conclusions

The results of the present study revealed that pomegranate peel, combined with or without probiotics, have a remarkable effect on the modulation of oxidative stress and intestinal dysbiosis of DMH-treated rats. These findings also suggested that pomegranate peel powder and probiotics would act as a potential chemopreventive agent against chemically induced preneoplastic colonic lesions.

Authors' Contributions

RB carried out the experiment, was responsible for the experimental design and results interpretation, coordinated data analysis and wrote the paper. RB participated in the design of the study and performed the oxidative parameters. HH contributed to the interpretation of the histopathological results. SB aided in the statistical study. AR directed, coordinated and took the lead in writing the manuscript.

Conflict of Interest Disclosures

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

References

- Bhandari A, Woodhouse M, Gupta S. Colorectal cancer is a leading cause of cancer incidence and mortality among adults younger than 50 years in the USA: a SEER-based analysis with comparison to other young-onset cancers. *J Investig Med*. 2017;65(2):311-315. doi:10.1136/jim-2016-000229.
- Cohen C, Cardoso JF, Garcia SB, Vannucchi H. Vitamin E supplementation in chemical colorectal carcinogenesis: a two-edged knife. *Nutrients*. 2014;6(8):3214-3229. doi:10.3390/nu6083214.
- Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids*. 1992;27(10):807-813. doi:10.1007/bf02535855.
- Järvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Rissanen H, Heliövaara M. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. *Br J Cancer*. 2001;85(3):357-361. doi:10.1054/bjoc.2001.1906.
- Srihari T, Balasubramanian V, Nalini N. Role of oregano on bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental colon carcinogenesis. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86(10):667-674. doi:10.1139/y08-071.
- Trindade de Paula M, Poetini Silva MR, Machado Araujo S, et al. High-fat diet induces oxidative stress and MPK2 and HSP83 gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4018157. doi:10.1155/2016/4018157.
- Jucá MJ, Bandeira BC, Carvalho DS, Leal AT. Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. *J Coloproctol*. 2014;34(3):167-173. doi:10.1016/j.jcol.2014.06.003.
- Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):504-512. doi:10.1016/s1470-2045(10)70186-8.
- Lin C, Cai X, Zhang J, et al. Role of gut microbiota in the development and treatment of colorectal cancer. *Digestion*. 2019;100(1):72-78. doi:10.1159/000494052.
- Roller M, Pietro Femia A, Caderni G, Rechkemmer G, Watzl B. Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. *Br J Nutr*. 2004;92(6):931-938. doi:10.1079/bjn20041289.
- Nishino Y, Suzuki Y, Ohmori K, et al. Cancer incidence profiles in the Miyagi Cohort Study. *J Epidemiol*. 2004;14 Suppl 1:S7-11. doi:10.2188/jea.14.s7.
- Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016;30(1):17-25. doi:10.1016/j.bpg.2015.12.001.
- Roberfroid MB. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition*. 2000;16(7-8):677-679. doi:10.1016/s0899-9007(00)00244-6.
- Liu H, Liu X, Zhang C, et al. Redox imbalance in the development of colorectal cancer. *J Cancer*. 2017;8(9):1586-1597. doi:10.7150/jca.18735.
- Karimi M, Sadeghi R, Kokini J. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. *Trends Food Sci Technol*. 2017;69(Pt A):59-73. doi:10.1016/j.tifs.2017.08.019.
- Cortés-Martín A, García-Villalba R, González-Sarrías A, et al. The gut microbiota urolithin metabolites revisited: the human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. *Food Funct*. 2018;9(8):4100-4106. doi:10.1039/c8fo00956b.
- Nozohour Y, Golmohammadi R, Mirnejad R, Fartashvand M. Antibacterial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed and peel alcoholic extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from health centers. *J Appl Biotechnol Rep*. 2018;5(1):32-36. doi:10.29252/jabr.01.01.06.
- Li Z, Summanen PH, Komoriya T, et al. Pomegranate ellagitannins stimulate growth of gut bacteria in vitro: implications for prebiotic and metabolic effects. *Anaerobe*. 2015;34:164-168. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.05.012.
- Durand G, Beaudeau JL. *Biochimie Médicale: Marqueurs Actuels et Perspectives*. Paris: Médecine Sciences Publications-Lavoisier; 2011. p. 144.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292.
- Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL, eds. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Basel: Birkhäuser; 1995:237-248. doi:10.1007/978-3-0348-9074-8_17.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*. 1976;15(2):212-216. doi:10.1016/0006-2944(76)90049-1.
- Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. London: Churchill Livingstone; 2008. p. 724.
- Chang JH, Shim YY, Cha SK, Reaney MJT, Chee KM. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFR1342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 3):361-368. doi:10.1099/jmm.0.035154-0.
- Hossin FLA. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) peels and its extract on obese hypercholesterolemic rats. *Pak J Nutr*. 2009;8(8):1251-1257. doi:10.3923/pjn.2009.1251.1257.
- El-Shafie HA, Yahia NI, Ali HA, Khalil FA, El-Kady EM, Moustafa YA. Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus plantarum* NRRL-B-4524 and *Lactobacillus paracasei* in mice with hypercholesterolemia induced by diet. *Aust J Basic Appl Sci*. 2009;3(1):218-228.
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018;57(1):1-24. doi:10.1007/s00394-017-1445-8.
- Ito H. Metabolites of the ellagitannin geraniin and their antioxidant activities. *Planta Med*. 2011;77(11):1110-1115. doi:10.1055/s-0030-1270749.
- Selma MV, González-Sarrías A, Salas-Salvadó J, et al. The gut microbiota metabolism of pomegranate or walnut ellagitannins yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: comparison between normoweight, overweight-obesity and metabolic syndrome. *Clin Nutr*. 2018;37(3):897-905. doi:10.1016/j.clnu.2017.03.012.
- Sadeghipour A, Eidi M, Ilchizadeh Kavani A, Ghahramani R, Shahabzadeh S, Anissian A. Lipid lowering effect of *Punica granatum* L. peel in high lipid diet fed male rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:432650. doi:10.1155/2014/432650.
- Perše M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:473964. doi:10.1155/2011/473964.
- Hamiza OO, Rehman MU, Tahir M, et al. Amelioration of 1,2 dimethylhydrazine (DMH) induced colon oxidative stress, inflammation and tumor promotion response by tannic acid in Wistar rats. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(9):4393-4402. doi:10.7314/apjcp.2012.13.9.4393.
- Thangaraj K, Natesan K, Settu K, et al. Orientin mitigates 1,2-dimethylhydrazine induced lipid peroxidation, antioxidant and biotransforming bacterial enzyme alterations in experimental rats. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(6):1379-1388. doi:10.4103/jcrt.JCRT_1363_16.
- Salwe KJ, Sachdev DO, Bahurupi Y, Kumarappan M. Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. *J Nat Sci Biol Med*. 2015;6(1):56-62. doi:10.4103/0976-9668.149085.

35. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
36. Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem.* 2006;17(9):611-625. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.09.004.
37. Ahmed HH, El-Abhar HS, Hassanin EAK, Abdelkader NF, Shalaby MB. *Punica granatum* suppresses colon cancer through downregulation of Wnt/ β -Catenin in rat model. *Rev Bras Farmacogn.* 2017;27(5):627-635. doi:10.1016/j.bjpp.2017.05.010.
38. Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, et al. The probiotic *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and pro-inflammatory status in obese mice. *Clin Sci (Lond).* 2014;127(1):33-45. doi:10.1042/cs20130339.
39. Sun J, Shi YH, Le GW, Ma XY. Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus* sp. *World J Gastroenterol.* 2005;11(40):6330-6337. doi:10.3748/wjg.v11.i40.6330.
40. Urbanska AM, Bhatena J, Martoni C, Prakash S. Estimation of the potential antitumor activity of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* yogurt formulation in the attenuation of tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *Dig Dis Sci.* 2009;54(2):264-273. doi:10.1007/s10620-008-0363-2.
41. Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Br J Nutr.* 2013;109(5):802-809. doi:10.1017/s0007114512002206.
42. Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 2007;73(5):461-467. doi:10.1055/s-2007-967167.
43. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(25):11537-11542. doi:10.1073/pnas.1001261107.
44. Bialonska D, Kasimsetty SG, Schrader KK, Ferreira D. The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *J Agric Food Chem.* 2009;57(18):8344-8349. doi:10.1021/jf901931b.
45. Keddari S, Aldib I, Riaz A. In vivo stimulatory effects of wheat bran on intestinal microbial ecosystem of mice. *South Asian J Exp Biol.* 2014;4(1):24-32.
46. Thirabunyanon M, Hongwittayakorn P. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;169(2):511-525. doi:10.1007/s12010-012-9995-y.



Phytochemical analysis, antibacterial and antioxidant activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts

Rachida Benguiar¹, Imene Yahla¹, Rachida Benaraba², Sarah Bouamar¹, Ali Riazi^{1*}

¹Laboratory of Beneficial Microorganisms, Functional Food and Health, Department of Food Science, Faculty of Nature and Life Sciences, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, 27000 Algeria

²Laboratory of Improvement and Valorization of Local Animal Productions, Department of Nature and Life Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, Ibn Khaldoun University, Tiaret, 14000 Algeria

Key words: *Punica granatum* L, Phenolic compounds, Flavonoids, Antibacterial activity, Antioxidant activity.

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/16.6.35-44>

Article published on June 16, 2020

Abstract

The pomegranate and their derivative parts are rich source of phytochemicals with multiple beneficial biological effects. This study aims to extract the phenolic compound from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel using methanol and ethanol in order to assess their antioxidant and antibacterial activities. The phenolic compounds and flavonoids content were measured using colorimetric methods. The antioxidant activity was determined by ferric reducing antioxidant power (FRAP). Furthermore, the antibacterial activity of peel extracts was tested on Gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and Gram negative bacteria (*Escherichia coli*) using the agar diffusion and microbroth dilution methods. The results have shown that the pomegranate peel of both extracts contained a similar amount of phenolic compounds and flavonoids. However, the antioxidant activity was significantly ($p < 0.05$) higher in ethanolic extract with EC_{50} value of $58.42 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ compared to methanolic extract ($EC_{50} = 80 \pm 1 \mu\text{g/mL}$). Both extracts exhibited a good antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* with minimal inhibitory concentration (MIC) values ranging from 0.97 to 3.9 mg/mL and minimal bactericidal concentration (MBC) values ranging from 7.81 to 62.5 mg/mL. According to these findings, the pomegranate peel extracts have an important antibacterial and antioxidant properties and may be used as an alternative to antibiotics in the treatment of infections and in the prevention of pathologies associated with oxidative stress.

* Corresponding Author: Ali Riazi ✉ ardz22003@yahoo.fr

Introduction

The increasing of antibiotics resistant microbes and the undesirable effect of synthetic drugs led researchers to focus on alternative solution derived from medicinal herb (Patel *et al.*, 2011). Many studies have reported the antimicrobial and antioxidative properties of medicinal plants and their components (Kusuma *et al.*, 2014). The therapeutic properties of these natural products are due to the presence of wide variety of secondary metabolites, like polyphenols. These biomolecules, with therapeutic virtues, have received considerable attention because of their diverse biological function.

The pomegranate fruit (*Punica granatum*. L) is one of the oldest fruits, it is cultivated mainly in the Mediterranean region, has been used for several centuries in traditional medicine for a wide variety of diseases such as parasitic and microbial infections, ulcers, diarrhea and cancers (Kim *et al.*, 2002 ; Reddy *et al.*, 2007; Johanningsmeier and Harris, 2011). Pomegranate can be eaten fresh or made into fruit juice, jellies and jams; however the consumption of this fruit generates considerable quantities of by-products. Indeed, pomegranate peels are frequently rejected without recovery. Thus, pomegranate peel contains important phytochemical compounds such as tannins and anthocyanins (Gil *et al.*, 2000; Zaouay *et al.*, 2012). These bioactive compounds possess different biological activities such as scavenging of free radicals, inhibiting microbial growth and reducing the risk of cardiovascular, cerebrovascular diseases and certain cancers (Mena *et al.*, 2011; Zhu and Liu, 2013; Romeo *et al.*, 2015). Pomegranate peel can be considered as natural products which have become widely used for medical and food applications, therefore, several studies have interested to find pomegranate peel valorization methods and to determine their therapeutic benefits. It is necessary to pay particular attention to the process and type of solvent extraction to determine the extract with optimal efficiency which makes it possible to restore all the molecular complexity of this plant. In this context, the objective of this study is to determine the phytochemical antibacterial and

antioxidant activities of pomegranate peel extracts.

Materials and methods

Chemicals

Folin-Ciocalteu, Gallic acid, Resorcinol, Rutin, Syringic acid, Quercetin and Ascorbic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other solvents and chemicals were of analytical grade.

Plant material

The pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit type used in this study is known as "Séfri"; it comes from the region of Mostaganem (35°55'59.999"N and 0°4'59.999"E in Algeria). The pomegranate peels were dried in dark at room temperature, then ground with a mechanical grinder (Pulverisette, Fritsch, Germany).

Bacterial strains

The strains used to evaluate antibacterial activity are: *Escherichia coli* ATCC 10536, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Staphylococcus aureus* ATCC 10876. They were kindly provided by the microbiology unit of the SAIDAL group, Media (Algeria).

Extraction of phenolic compounds

A 10 g of powder was macerated in 125 mL of methanol or ethanol for 24 h at room temperature and in the dark. The extracts were filtered through Wattman n°1 filter paper. The filtrate obtained was evaporated using a rotary evaporator in order to obtain a dry extract. The extracts were kept at -20 °C (Hadrich *et al.*, 2014).

Phytochemical analysis

Phenolic compounds determination

The total phenolic compounds were estimated according to the Folin-Ciocalteu method (Singleton *et al.*, 1999). Briefly, 250 µL of the extract was added to 250 µL of Folin Ciocalteu reagent (0.2 N), the mixture was incubated at room temperature for 2 min before 500 µL of Na₂CO₃ (7.5%, w/v) were added. The reaction mixture was then incubated for 30 min at room temperature and in dark. The absorbance was

measured at 760 nm against a blank without extract using a spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Japan). The content of phenolic compounds is expressed as mg Gallic Acid Equivalent per g of dry matter (mg EAG / g DM) by referring to the calibration curve for gallic acid.

Flavonoids contents

The content of the total flavonoids was determined by the method of Bahorun *et al.* (1996). A 1 mL of the extract solution was added to 1 mL of AlCl_3 (2% w/v), after 10 min of incubation, the absorbance was read at 430 nm using a UV-visible spectrophotometer. Total flavonoid content is calculated from the calibration curve performed by quercetin. The results are expressed as mg quercetine equivalent per g dry matter (mg EQ / g DM).

Analysis of phenolic compounds by HPLC

The analysis of phenolic compounds in pomegranate peel extracts was carried out using a high performance liquid chromatography (HPLC) Agilent YL9100 system equipped with a UV detector (254 nm). The separation was performed with a reverse phase column (Zorbax eclipse×DB-C18), 15 cm long and 4.6 mm internal diameter, using a flow rate of 1 mL / min, and a mobile phase: acidified water / acetic acid 1% (A) and methanol 100% (B), at a temperature of 25°C and detection at 254 nm. The gradient elution started with 95% of solvent A and 5% of solvent B and increase of solvent B to 95%, after 55 min.

Phenolic compounds of each pomegranate peel extract sample were identified by comparing their retention times (Rt) with those of the pure standards injected in the same conditions.

Antioxidant activity evaluation

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The reducing power of iron (Fe^{3+}) in the extract was determined according to the method described by Yen and Duh, (1993). 1 mL of the extract at different concentrations were mixed with 2.5 mL of phosphate buffer solution (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of a potassium ferricyanide solution $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%, w/v).

The mixtures were incubated at 50°C for 20 min. After incubation, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%,w/v) was added to stop the reaction. Finally, 1 mL of upper layer was mixed with 1 mL of distilled water and 0.5 mL of ferric chloride FeCl_3 (1%, w/v), the absorbance was measured at 700 nm against a blank. An increase in absorbance of the reaction corresponds to an increase in the reducing power of the tested extract. The reducing potential of the extract and of the standards is expressed by the effective concentration values at 50% (EC_{50}).

Evaluation of the antibacterial activity

Diffusion method agar

Bacterial suspension was prepared in sterile physiological water (0.9%) for each strain. The turbidity of this suspension has been adjusted to 0.5 Mac Farland. This inoculum was spread on the surface of Mueller-Hinton agar plate. Sterile filter discs (6 mm in diameter) were impregnated with 20 μL of each extract solution then were deposited on the surface of the inoculated agar. The plates were incubated at 37°C for 24 h (Adesokan *et al.*, 2007). Tetracycline and chloramphenicol antibiotic discs (Merck, Germany) served as positive controls and discs impregnated with dimethyl sulfoxide (DMSO) served as negative controls. Antibacterial activity was determined by measuring the diameter of the inhibition zone around each disc.

Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC)

Microdilution assay was determined according to the method described by Klančnik *et al.* (2010). Two-fold serially diluted pomegranate peel extracts were prepared in sterile Mueller-Hinton broth. 95 μL of each solution were deposited in the wells of a 96-well microplate plate, and then 5 μL of each bacterial suspension was added to the wells. The final volume in each well was 100 μL . The wells containing the Muller Hinton broth alone were used as a negative control, while the wells containing the Mueller Hinton inoculated with the each bacterium—and without extract were used as positive controls. The microplates thus prepared were incubated for 18 h at

37°C. At the end of this incubation the bacterial growth was visualized by adding 20 µL of 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich). Bacterial growth was indicated by red colour while clear wells recorded inhibition growth. The MIC was recorded from the lowest concentration of the extract that inhibits the visible bacterial growth. The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined as the lowest extract concentration that killed 99% of bacteria in the initial inoculums within 24 h.

Statistical analysis

The results obtained were expressed as means ± standard deviation (SD). The statistical analysis of the data was carried out using the STATISTICA software (version 6.1, Stat soft, Tulsa, OK, USA). The

comparison of the means was carried out via ANOVA with a factor, followed by the tukey Test. A value of $p < 0.05$ was used as the significance level.

Results and discussion

Yield extraction, quantification of phenolic compounds and flavonoids

The yield extraction obtained from the pomegranate peel using methanol was a high yield of $41 \pm 1.73\%$ (w/w) compared to the ethanolic extract with an average of $31 \pm 2.47\%$ (w/w). These results are approximately similar to those obtained by Shibani *et al.* (2012) where the yield was 45%. Another studies indicated that methanolic extract represents yield ranging from 31.5 to 48.2% (Li *et al.*, 2006; Zaki *et al.*, 2015).

Table 1. Diameters of inhibition zones (mm) of pomegranate peel extracts and antibiotic discs against the tested bacteria.

PPEE (mg/mL)	Bacteria		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
250	14.17 ± 0.29 ^a	15.33 ± 0.58 ^b	11 ± 1 ^c
125	12 ± 1 ^a	12.67 ± 0.58 ^a	8.67 ± 0.58 ^b
62.5	10 ± 1 ^a	10.67 ± 0.58 ^a	7.67 ± 0.58 ^b
PPME (mg/mL)			
250	19.67 ± 2.52 ^a	20 ± 1.73 ^a	13 ± 1 ^b
125	14.33 ± 0.57 ^a	17.33 ± 0.58 ^b	11.33 ± 0.58 ^c
62.5	10.33 ± 1 ^a	12 ± 1 ^a	9.33 ± 1.15 ^b
Antibiotics			
Chloramphenicol (30 µg/mL)	33.66	30	21
Tetracycline (20 µg/mL)	28.33	19	15.115151515.33

The values represented are the mean ± SD. PPEE: Pomegranate peel ethanolic extract; PPME: Pomegranate peel Methanolic extract; Different letters (a,b,c) indicate significant differences ($p < 0.05$).

These variations observed between the yields are may be due to the type of solvent in fact, it affects the extraction; it is clear that there is an affinity between the extraction solvent and the extracted compounds, as well as its biological activity (Lee *et al.*, 2003; Ghasemzadeh *et al.*, 2011). Furthermore, It is established that variations in extraction yields could be attributed not only to the difference in solvent polarity, which plays a key role in increasing the solubility of phenolic compounds; but also the polarity of the phenolic compounds which constitute the extract (Felhi *et al.*, 2017). The quantitative

analysis of the phenolic and flavonoid contents of the pomegranate peel extracts was determined from the linear regression equations of each calibration curve expressed successively in mg EGA/g DM and in µgEQ/g DM respectively. Thus, the results obtained are illustrated in Fig 1. and 2. In this study, the total phenolic contents were in order to 379.61 ± 31.71 mg EAG / g DM for methanolic extract and 381.51 ± 32.39 mg EAG / g DM for the ethanolic extract. This quantification showed no significant difference between the methanol and ethanol pomegranate peel extracts.

Table 2. Minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal (MBC) concentrations of pomegranate peel extracts against the tested bacteria.

Bacteria	PPEE (mg/mL)		PPME (mg/mL)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Bacillus subtilis</i>	3.9	62.5	3.9	31.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.90	31.25	0.97	7.81
<i>E.coli</i>	7.81	62.5	7.81	62.5

PPEE: Pomegranate peel ethanolic extract; PPME: Pomegranate peel Methanolic extract.

The flavonoid contents of the methanolic and ethanolic extracts were found to be similar and equal to 50.95 ± 11.57 and 53.64 ± 12.31 mg EQ / g DM, respectively. This result is in agreement with that reported by Hadrich *et al.* (2014). These authors noted that the total phenolic compounds in the

extracts obtained after 24 h of maceration varied from 0 to 290.10 ± 0.57 mg EAG / g DM. Another study showed that the phenolic content of the methanolic extract from the pomegranate peel was around 274 mg EAG/ g and 56.4 mg RE /g of flavonoids (Shiban *et al.*, 2012).

Table 3. Efficient concentration 50 (EC₅₀) of different pomegranate peel extracts and standard antioxidants in reducing power.

	EC ₅₀ (µg/mL)
PPEE	58.42 ± 0.21^a
PPME	80 ± 1.00^b
Gallic acid	17.56 ± 0.44^c
Quercetin	35.76 ± 0.84^d
Ascorbic acid	44.20 ± 0.84^e

The values represented are the mean \pm SD. PPEE : Pomegranate peel ethanolic extract ; PPME :Pomegranate peel Methanolic extract ; Different letters (a,b,c,d,e) indicate significant differences ($p < 0.05$).

HPLC analysis

The HPLC chromatograms of pomegranate peel ethanolic and methanolic extracts are shown in Figure 3 .The polyphenols profile of the pomegranate peel extracts were similar, however peak area of individual compounds varied. The results of the present study revealed that the Gallic acid, Resorcinol, Punicalagin, Rutin, Syringic acid and Quercetin were most abundant phenolic compounds in both extracts. Several studies have shown the presence of different phenolic compounds in pomegranate peel extracts. The presence of gallic acid, chlorogenic, caffeic acid tannic acid and Rutin pomegranate peel extracts was reported by Shaban *et al.* (2013); while Cai *et al.* (2004) and Ahmed *et al.* (2018) highlighted the presence of vanillic acid and quercetin. Gullon *et al.* (2016) also reported the presence of punicalagin and ellagic acid as main

bioactive compounds in pomegranate peel.

The difference in the content of phenolic and flavonoid compounds is well documented. This can be explained by the fact that the type of solvents, the methods and the extraction time can significantly influence the content of phenolic and flavonoids in different extracts (Grujic *et al.*, 2012).

Antioxidant activity of pomegranate peel extracts Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

The results of the reducing power of pomegranate peel extracts were proportional to the increase in the concentration of the extracts (Fig. 4). Indeed, the ethanolic extract showed a higher reducing power in comparison with the methanolic extract (58.42 ± 0.22 vs 180 ± 5.29 µg/mL). However, this iron-reducing power remains lower compared to the reducing power

of standard antioxidants such as gallic acid and ascorbic acid. This is noted by EC_{50} (Gallic acid: 17.56 ± 0.45 ; ascorbic acid: $44.20 \pm 0.84 \mu\text{g} / \text{mL}$) (Table 3). This high reducing power of the pomegranate peel extract may be due to the presence of certain bioactive compounds such as ellagitannins, punicalin, punicalagin and numerous piperidine alkaloids (Gullon *et al.*, 2016).

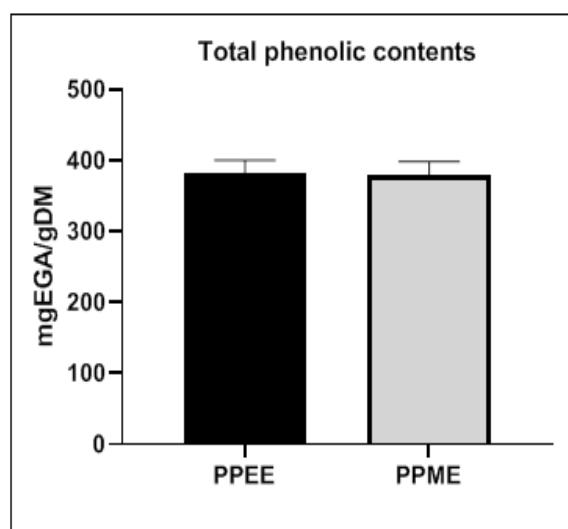


Fig. 1. Total phenolic contents of pomegranate peel extracts.

The results are expressed as means \pm SD. PPEE: Pomegranate peel ethanolic extract; PPME: Pomegranate peel methanolic extract; mg GAE /gDM: mg Gallic acid equivalent/g dry matter.

Antibacterial activity

The obtained result highlighted that the ethanolic and methanolic extracts have an inhibitory effect on the growth of all tested bacteria (*E.coli*, *B. subtilis* and *S. aureus*) as shown in Table 1. The diameters of the inhibition zones were ranging from 10 to 20 mm for the methanolic extract and 10 to 15.33 mm for the ethanolic extract. Indeed the Gram positive bacteria *S. aureus* and *B. subtilis* were the most sensitive in comparison with the Gram negative bacteria *E. coli*, and this could be related to the difference in the wall structure between Gram positive and negative bacteria (Ali-Shtayeh *et al.*, 1998).

These results are in agreement with those reported by Malviya *et al.* (2014), who showed that *S. aureus* is sensitive to the methanolic and ethanolic

pomegranate peel extracts with diameter inhibition zones of 24 ± 0.53 mm and 20 ± 0.31 mm, respectively; unlike *E. coli* which has been shown to be resistant to these same compounds (7 mm) (Naziri *et al.*, 2012). Thus, the resistance of bacteria to these extracts can be attributed to the nature and the composition of lipopolysaccharides of the cell wall of these strains.

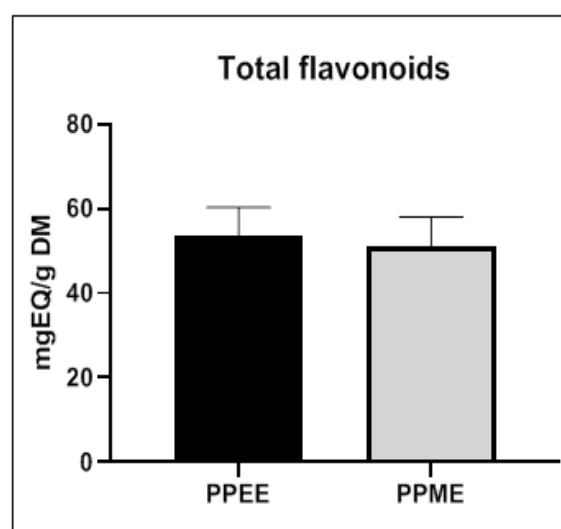


Fig. 2. Total flavonoids contents of pomegranate peel extracts.

The results are expressed as means \pm SD. PPEE: Pomegranate peel ethanolic extract; PPME: Pomegranate peel methanolic extract; mg QE/gDM: mg Quercetin equivalent/g dry matter;

Determination of the minimal inhibitory concentrations (MIC)

The results of the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC) evaluated by the microdilution method suggest that both extracts of pomegranate peel exert different degrees of antibacterial activity (Table 2). The most powerful inhibitory effect of methanolic extract was observed against *S. aureus* with MIC of 0.97 mg/mL followed by *B. subtilis* and *E. coli* with MIC of 3.9 and 7.81 mg/mL, respectively. Whereas, the strains of *S. aureus* and *B. subtilis* were sensitive to the ethanolic extract, in particular with an MIC of 3.9 mg/mL and MBC ranging from 31.5 to 62.5 mg/mL, respectively; in comparison with *E. coli*, where the MIC and MBC obtained were around 7.81 and 62.5 mg/mL, respectively.

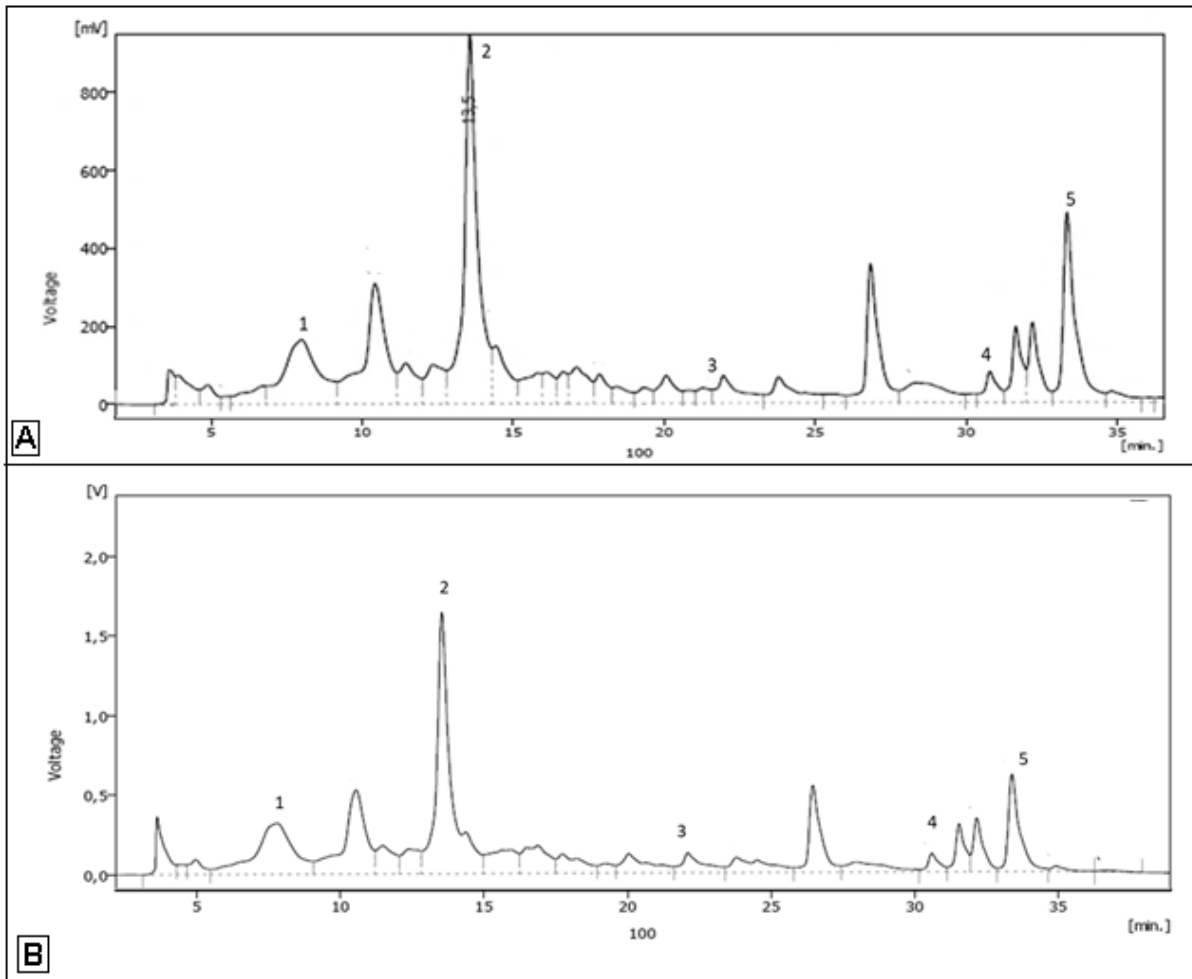


Fig. 3. HPLC chromatograms of pomegranate peel extracts A) Ethanol extract B) Methanolic extract. 1: Gallic acid; 2: Punicalagin; 3: Syringic acid; 4: Rutin; 5: Quercetin.

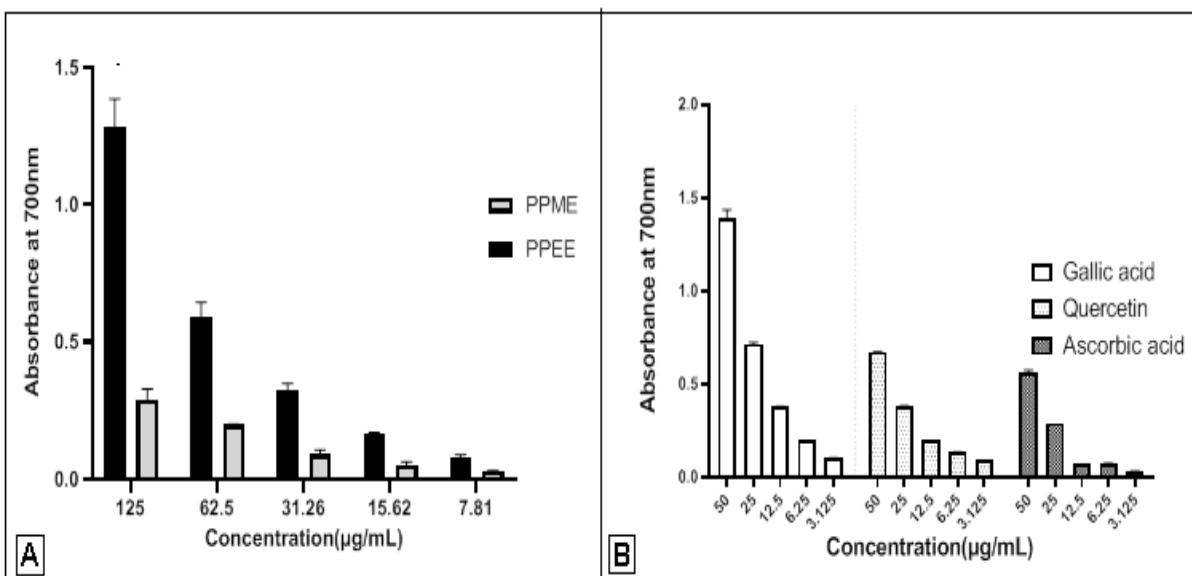


Fig. 4. Reducing power activity of pomegranate peel extracts, gallic acid, quercetin and ascorbic acid evaluated by FRAP method.

The results are expressed as means \pm SD. PPEE: Pomegranate peel ethanol extract; PPME: Pomegranate peel methanolic extract.

These findings are in agreement with those of Naziri *et al.* (2012), who reported that the methanolic extract of the pomegranate peel exerts an inhibitory effect on Gram positive bacteria compared to those of Gram negative bacteria. Therefore, the MIC of the extract of the pomegranate peel determined by the method of dilution against *E. coli* and *S. aureus* were 31.3 mg /mL and 7.8 mg /mL, respectively. This is in agreement with the results of Naz *et al.* (2007). These authors have investigated the effect of different extracts of pomegranate on six bacterial species: *S. aureus*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *B subtilis*, *Salmonella typhi*, and have shown that both extracts exert an antibacterial activity against all tested bacteria. The antimicrobial activity of pomegranate peel extract is believed to be due to its phytochemical composition, and in particular, to the nature of its major phenolic compounds. It can also be attributed to one or more molecules, present in low proportion (s) in the extract (Mphahlele *et al.*, 2016).

Conclusion

This study has shown that the yield of pomegranate peel extract was higher than that of the ethanolic one. However, similar amounts of phenolic compounds and flavonoids were found in both extracts.

The antioxidant activity was significantly ($p < 0.05$) higher in ethanolic extract. Both extracts exhibited a strong antibacterial activity against Gram positive bacteria (*S. aureus* and *Bacillus subtilis*) than against the Gram negative (*E. coli*). These extracts are promising agents for the prevention of pathologies associated with oxidative stress.

Further studies such as identification of bioactive molecules of pomegranate peel extracts are needed to determine the effectiveness of each molecule in the antioxidant and antibacterial activities.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (PRFU Project N° DOOLoUN270120190003).

References

- Adesokan AA, Akanji MA, Yakubu MT.** 2007. Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark. *African Journal of Biotechnology* **6**, 2502- 2505.
<http://dx.doi.org/10.5897/AJB2007.000-23.97>.
- Ahmed W, Shahid M, Afzal U, Kabir F, Ahmad MS, Gulfra M.** 2018. Chemical analysis and assessment of the in vivo and in vitro bioactivities of seeds and peels extracts of pomegranate. *International Journal of Biosciences* **13**, 230-238.
<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/13.5.230-238>.
- Ali-Shtayeh MS, Yaghmour RM, Faidi YR, Salem K, Al-Nuri MA.** 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology* **60**, 265- 271.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00153-0).
- Bahorun T, Grinier B, Trotin F, Brunet G, Pin T, Luncky M, Vasseur J, Cazin M, Cazin C, Pinkas M.** 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung* **46**, 1086-1089.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H.** 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* **74**, 2157- 2184.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Felhi S, Daoud A, Hajlaoui H, Mnafigui K, Gharsallah N, Kadri A.** 2017. Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits. *Food Science and Technology* **37**, 1-10.
<https://doi.org/10.1590/1678-457x.23.516>
- Ghasemzadeh A, Hawa Z, Jaafar E, Asmah R.** 2011. Effects of solvent type on phenolics and

flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**, 1147-1154.

Gil MI, Tomàs-Barberà FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **48**, 4581-4590

Gullon B, Pintado ME, Perz-alvarez JA, Viuda marto M. 2016. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co product of juice extraction. *Food control* **59**, 1-20.

Grujic N, Lepojevic Z, Srdjenovic B, Vladic J, Sudji J. 2012. Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. *Molecules* **17**, 2518-2528.
<https://doi.org/10.3390/molecules17032518>.

Hadrich F, Cherif S, Talel Gargouri Y, Sayari A. 2014. Antioxydant and lipase inhibitory activities and essential oil composition of pomegranate peel extract. *Journal of Oleon Science* **63**, 515-525.
<https://doi.org/10.5650/jos.ess13.163>.

Johanningsmeier SD, Harris GK. 2011. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology* **2**, 181-201.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030810-153709>.

Kim ND, Mehta R, Yu, W, Lansky E. 2002. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **71**, 203-217.

Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to

determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* **81**, 121-6.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>.

Kusuma I, Murdiyanto W, Arung ET, Syafrizal Kim YU. 2014. Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. *Food Science and Human Wellness* **3**, 191-196
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.12.004>

Lee JS, Choi MS, Jeon SM, Jeong TS, Park YB. Lee MK, Bok SH. 2003. Lipid-lowering and antioxidative activities of 3,4-di(OH)-cinnamate and 3,4-di(OH) hydrocinnamate in cholesterol-fed rats. *Clinica Chimica Acta* **314**, 221-230.
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)0070.0-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)0070.0-8).

Li Z, Seeram NP, Lee R, Thames G, Minutti C, Wang HJ, Heber D. 2005. Plasma clearance of Lovastatin versus Chinese Red Yeast Rice in healthy volunteers. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* **11**, 1031-1038.

Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* **96**, 254-260.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>.

Malviya S, Arvin A J, Hettiarachechy N. 2014. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of Food Science Technology* **51**, 4132-4137.

Mena P, Garcia-Viguera C, Navarro-Rico J, Moreno D, Bartual J, Saura D, Marti N. 2011. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food Agriculture* **91**, 1893-1906.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.44.11>.

Mphahlele RR, Fawole OA, Opara UL. 2016. Effect of drying on the bioactive compounds,

antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complementary Medicine and Therapy* **16**, 1-12.

Naziri Z, Rajaian H, Firouzi R. 2012. Antibacterial effects of Iranian native sour and sweet pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts against various pathogenic bacteria. *Iranian Journal of Veterinary Research* **13**, 282-288.

Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool S, Sayeed S. 2007. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science* **7**, 341-345.

<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00533.x>

Patel RV, Thaker VT, Patel VK. 2011. Antimicrobial activity of ginger and honey on isolates of extracted carious teeth during orthodontic treatment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **1(1)**, 58-61.

[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60124-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60124-X).

Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum L.* *Planta Medica* **73**, 461-467.

Romeo FV, Ballistreri G, Fabroni S, Pangallo S, Nicosia MG, Schena L. 2015. Chemical characterization of different sumac and pomegranate extracts effective against botrytis cinerea rots. *Molecules* **20**, 11941-11958.

<https://doi.org/10.3390/molecules200711.941>

Shaban NZ, El Kersh MAL, El-Rashidy FH, Habashy NH. 2013. Protective role of punica

granatum peel and seed oil extracts on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatic injury in male rats. *Food chemistry* **141**, 1587-1596.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.13.4>

Shiban MS, Al otaibi MM, Al Zoreky NS. 2012. Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences* **3**, 991- 996.

Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventos R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**, 152-178.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

Yen GC, Duh PD. 1993. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **70**, 383-386.

Zaouay FP, Mena C, Garcia-Viguera, Mars M. 2012. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars. *Industrial Crops and Products* **40**, 81-89.

Zaki HA, Abdelatif SH, Abdelmohsen NR, Ismail FA. 2015. Phenolic compounds and antioxidant activities of pomegranate peels. *International Journal of Food Engineering* **1**, 73-76.

Zhu C, Liu X. 2013. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from: Pomegranate peel by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* **92**, 1197-1202.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.073>.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Communications

Benguiar R.; Benaraba R Hemida H; Ayad N; Riazi A . Etude de L'effet Préventif de L'écorce de grenade/probiotique sur la composition du microbiote intestinal chez le rat *Wistar* chimioinduit.6 ème Symposium International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales, SIPAM6, 16-18 Novembre 2017, Marrakech, MAROC <http://sipam6.uca.ac.ma>

Benguiar R.; Benaraba R. ; Bellal A, ;Bentata I. ;Bachir bouiadjra M ; Riazi A. Etude de l'effet (probiotique/ écorce de grenade) contre les troubles oxydatifs induits par un régime HG/DMH. The First International Congress on Biotechnologies for Sustainable Development CIBSDD.University of M'hamedBougaraBoumerdes24-25October 2017.Boumerdes. Algeria.

Benguiar R. Benaraba R. Riazi A.Influence de l'écorce de grenade combinée ou non aux probiotiques sur les troubles oxydatifs et le microbiote intestinal associés aux lésions pré-cancéreuses coliques chez le rat wistar.7 ème Colloque International Sciences et Environnement. Université de Carthage. Faculté desSciences de Bizerte. 20-22 Mars 2018 .Tunisie.

Benguiar R. Benaraba R. Hemida H.; Riazi A. Effet de *Punica granatum L.* sur la dysbiose intestinale associée aux lésions cancéreuses coliques induites chez un modèle animal. Les Premières Journées Internationales de Microbiologie, Société Tunisienne de Microbiologie, Hammamet 8-10 Mars 2019.

Activités scientifiques

Workshops

1^{er} Cours International en Expérimentation Animale organisé par l'Association Algérienne des Sciences en Expérimentation Animale (AASEA) en collaboration avec le Conseil International des Sciences des Animaux de laboratoire (ICLAS) et en partenariat avec l'Institut Pasteur d'Algérie IPA.17 -22 Novembre 2018 Alger.

Workshop de FELASA sur l'évaluation du degré de gravité et la classification des procédures Alger, Algérie 18 Novembre 2018.

Les bonnes pratiques en expérimentation animale, 1^{er} workshop en expérimentation animale, 10 Avril 2019 à l'Institut Vétérinaire de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Formation

Formation sur HPLC et LC-MS-MS au centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimique(CRAPC) Bou-Ismaïl.Alger, 12-13 juillet 2017.