



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de Master « Biotechnologie des microorganismes »

THEME

**Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des
composés phénoliques d'extrait des écorces de**

***Punica granatum* (Grenade)**

Présenté par

-M'lle SAFI AHLEM

-M'lle BENBRAHIM RACHIDA

Soutenue devant les jurys :

Mr MEKHALDI. A.	(Pr Univ. A/ Benbadis Mostaganem)	Président
Mr DJIBAOUI .R.	(Pr Univ. A/ Benbadis Mostaganem)	Examineur
Mme REBAI .O.	(MCA Univ. A/ Benbadis Mostaganem)	Encadreur
Mme BENSLIMANE .S.	(Doctorante Univ. A/ Benbadis Mostaganem)	Co-encadreur

Année universitaire 2016-2017

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de l'université Abd El Hamid Ibn Badis

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre encadreur Mme Rebai Ouafae et à notre co-encadreur Mme Benslimane Sabria pour l'aide compétente qu'elles nous ont apportée, pour leur patience, leur confiance, leur encouragement, et leur œil critique qui nous a été très précieux pour structurer notre travail de fin d'études, nous les remercions vivement.

Nos vifs remerciements vont au professeur Mr MEKHALDI. A. pour l'honneur qu'il nous fait de présider ce jury. Nous remercions également chaleureusement Monsieur Djibaoui Rachid d'avoir accepté d'examiner ce travail. Ensuite nous tenons à remercier notre chef de département Mr Mdjahed Mustapha pour nous avoir donné la possibilité de manipuler au sein du laboratoire. Nous remercions nos familles pour l'amour qu'elles nous portent



Listes des figures

Figure n°01 Acide gallique.....	P 01
Figure n°02 Acide ellagique.....	P 01
Figure n°03 l'umbelliférone.....	P 02
Figure n°04 scopolétine.....	P 02
Figure n°05 Squelette de base des flavonoïdes	P 03
Figure n°06 squelette de Flavonols.....	P 04
Figure n°07 Arbre du punica granatum	P 07
Figure n°08 Arbre de punica protopunica.....	P 09
Figure n° 0 9 Arbre de punica granatum.....	P 09
Figure n°10 Les feuilles du punica granatum.....	P 10
Figure n°11 Les fleurs du punica granatum.....	P 11
Figure n°12 La corolle du punica granatum.....	P 11
Figure n°13 Les fruits de grenade.....	P 12
Figure n°14 Les grains de punica granatum.....	P 12
Figure n°15 L'écorce du fruit.....	P 13
Figure n° 16 observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	P 16
Figure n° 17 observations microscopiques de <i>candida albicans</i>	P 18
Figure n° 18 Observation microscopique d' <i>enterococcus faecalis</i>	P 20
Figure n°19 observation microscopique du <i>streptococcus mutans</i>	P 22
Figure n°20 observation microscopique du <i>streptococcus salivarius</i>	P 23
Figure n°21 observation microscopique du <i>streptococcus constellatus</i>	P 26
Figure n°22 l'écorces de la grenade après broyage et séchage.....	P 27
Figure n°23 l'extraction d'extrait d'écorces de la grenades par macération...	P 27
Figure n°24 Concentration des filtrats par le rotavaport.....	P 28
Figure n°25 Dosage des polyphénols totaux.....	P 30
Figure n°26 Dosage des Tannins totaux.....	P 31

Figure n° 27 la reduction de DPPH de sa forme radicalaire a sa forme ,non radialaire.....	P 32
Figure n° 28 Secteur du rendement.....	P 37
Figure n° 29 Le filtrat obtenu avant la concentration par le rotavaport	P 37
Figure n°30 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	P 38
Figure n° 31 Teneur des extraits en polyphenols,à une concentration de 2 mg/ml.....	P 39
Figure n°32 courbe d'étalonnage de la quercetine (0,0025a 0,04mg /ml) ...	P 40
Figure n° 33 Teneur des extraits en Flavnoïdes,à une concentration de 2 mg/ml.....	P 40
Figure n°34 Courbe d'étalonnage de la catéchine (0,05 à 0,4 mg/ml).....	P 41
Figure n° 35 Teneur des extraits en Tanins, à une concentration de 2 mg/ml.	P 42
Figure n° 36 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH En fonction des différentes concentrations des extraits.....	P 43
Figure n°37 Les histogrammes de l'activité antioxydante.....	P 44
Figure n°38 observation microscopiques de streptococcus salivarius.....	P 45
Figure n°39 observation microscopiques d'enterococcus faecalis.....	P 46
Figure n°40 observation microscopiques de candida albicans	P 46
Figure n°41 observation microscopiques de staphylococcus aureus.....	P 46
Figure n°42 La sensibilité des souches de candida albicans vis-à-vis des extraits méthanolique, éthanolique et acetonique (40mg/ml).....	P 49
Figure n°43 La sensibilité des souches de candida albicans vis-à-vis des extraits méthanolique éthanolique et acétonique (20mg/ml).....	P 51
Figure n°44 La sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis des extraits méthanolique éthanolique et acétonique (40mg/ml).....	P 53
Figure n° 45 La sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis aux extraits méthanolique éthanolique et acétonique (20mg/ml).....	P 55

Figure n°46 La sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis aux antibiotiques standard.....	P 59
Figure n° 47 La sensibilité des souches de candida albicans vis-à-vis aux antifongique	P 61

Liste des Tableaux

Tab n°01 L'identité des souches.....	P 33
Tab. n° 02 Aspect, couleur et %rendement des différents extraits d'écorces de la grenade.....	P 37
Tab n° 03 Activité antifongique des extraits d'écorces de la grenade exprimée en diamètre d'inhibition (40mg/ml).....	P 48
Tab n°04. Activité antifongique des extraits d'écorces de la grenade exprimée en diamètre d'inhibition (20mg/ml).....	P 50
Tab n°05. Activité antibactérienne des extraits d'écorces de grenades exprimée en diamètre d'inhibition (40mg/ml).....	P 52
Tab n°06. Activité antibactérienne des extraits d'écorce de grenade exprimée en diamètre d'inhibition (20mg/ml).....	P 54
Tab n°07. Antibiogramme des germes étudiés en présence des antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm).....	P 57
Tab n°08 Antifongigramme des germes étudiés en présence de fluconazole, Econazole et clotrimazole (diamètre de la zone d'inhibition en mm).....	P 60

Sommaire

Introduction
Chapitre I Polyphénols d'origine naturelle : la genade (<i>Punica granatum</i>)	
Partie I structure et propriétés des polyphénols	
1- Classification des composés phénoliques.....	P 01
1-1-Acides phénols et les coumarines.....	P 01
1-1-1- Acides phénoliques.....	P 01
1-1-2-. Acides cinnamiques.....	P 02
1-1-2-1. Coumarines	P 02
1-2-. Flavonoïdes.....	P 02
1-2-1-Flavonols.....	P 03
1-2-2-Anthocyanes.....	P 04
1-3-. Tanins.....	P 05
2-Méthodes de caractérisation des composés phénoliques.....	P 05
2-1- Dosage des composés phénoliques totaux.....	P 05
2-2-Dosage des composés individuels par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	P 05
3-Pouvoir antioxydant des polyphénols	P 06
Partie II la grenade	
1-Historique	P 07
2-Taxonomie et nomenclature	P 08
3-Le genre <i>Punica</i>	P 09
4-Répartition géographique du grenadier.....	P 09
5-Etude botanique	P 10
5-1-Description générale du grenadier.....	P 10
5-2-Les feuilles.....	P 10
5-3-Les fleurs.....	P 10
5-4-Le calice.....	P 11
5-5- La corolle.....	P 11
5-6-Le gynécée.....	P 11
5-7 Les étamines.....	P 12
5-8-Les fruits	P 12
5-8-1-La baie. Le fruit du grenadier.....	P 12

5-9- Les graines	P 12
5-10-L'écorce du fruit.....	P 13
5-11- L'écorce de la racine	P 13
5-12-L'écorce de la tige.....	P 13
6- La culture du grenadier.....	P 14
7- Les exigences de milieu.....	P 14
7-1-Conditions climatiques.....	P 14
7-2-Le sol.....	P 14
8-Utilisation thérapeutique.....	P 14
9-Toxicité des composés phénoliques de la grenade	P 15

Chapitre II les souches microbienne

1-staphylococcus aureus

1-1-Définition et classification	P 16
1-2-Habitat	P 16
1-2-1-Chez l'être vivant	P 16
1-2-2-Dans l'environnement.....	P 17
1-2-3- Dans les aliments et leur environnement de production	P 17
1-3-Pouvoir pathogène	P 17

2- Candida albicans

2-1-Définition.....	P 18
2-2-Habitat.....	P 18
2-3-Pouvoir pathogène.....	P 18

3-Enterococcus faecalis

3-1-Définition	P 20
3-2-Habitat	P 20
3-3-Pouvoir pathogène	P 21

4- Streptococcus mutans

4-1-Définition	P 22
4-2-Habitat et pouvoir pathogène	P 22

5-Streptococcus .salivarius

5-1-Définition	P 24
5-2-Habitat	P 24
5-3-Pouvoir pathogene	P 24

6-Streptococcus constullatus

6-1-Définition.....	P 25
6-2-Habitat.....	P 25
6-3-Pouvoir pathogene.....	P 25

Chapitre III Matériels et méthode

Matériel végétal	P 27
1--Analyses phytochimiques.....	P 27
1-1-Préparation de l'extrait d'écorces de la grenade	P 27
1-2-Détermination du rendement.....	P 28
1-3-Analyses quantitatives des composés phénoliques.....	P 29
1-3-1-Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	P 29
1-3-1-1- Principe.....	P 29
1-3-1-2-Mode opératoire.....	P 29
1-3-2-Détermination de la teneur en flavonoïde totaux	P 30
1-3-2-1-Principe	P 30
1-3-2-2-Mode opératoire	P 30
1-3-3-Détermination de la teneur en Tanins Totaux	P 31
1-3-3-1- Principe.....	P 31
1-3-3-2-Mode opératoire.....	P 31
2-Evaluation de l'activité antioxydante.....	P 32
Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	P 32
2-1- Principe	P 32
2-2-Mode opératoire.....	P 32
3-Evaluation de l'activité antimicrobienne	P 33
3-1-Les souches microbiennes.....	P 33
3-2-Conservation des souches.....	P 34
3-3-Vérification de la pureté et de l'identité des souches.....	P 34
3-3- 1- Vérification de la pureté des souches	P 34
3-3-2 Confirmation de l'identité des souches	P 34

3-3-2-1- Test macroscopique	P 34
3-3-2-2- Test microscopique.....	P 34
3-3-2-3- Test de catalase.....	P 34
3-4- Les milieux de cultures	P 34
3-5-L'antibiogramme et L'antifongigramme.....	P 35
3-6-Test de l'activité antimicrobienne.....	P 35
3-6-1- Méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques).....	P 35
3-7-Analyse statistique	P 36

Chapitre IV Résultats et discussion

1-Rendement de l'extraction.....	P 37
2- Etude quantitative	P 38
2-1- Teneur en polyphénols totaux.....	P 38
2-2-Teneur en flavonoïdes	P 40
2-3-Teneur en Tanins totaux.....	P 41
3- Pouvoir antioxydant	P 42
4-Pouvoir antimicrobien	P 45
4-1-Confirmation de l'identité et la purté des souches.....	P 45
4-2-Effet des extraits de l'écorce de la grenade sur la croissance des souches (la methode de disque).....	P 47
4-3-Sensibilité aux antibiotiques et antifongiques (antibiogramme, antifongigramme)	P 56
Conclusion
Références bibliographiques
Annexe

Résumé

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Punica*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules ayant des activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Punica granatum*. Les extraits organiques de ce dernier ont été obtenus par macération en utilisant trois solvants: éthanol, méthanol et l'acétone. Les rendements respectifs sont de: 15,113%, 33,913 % et 56,9 %. La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 200, 180 et 80 mg Eg AG/g (équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait) dans les trois extraits éthanol, acétone et méthanol respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode AlCl₃, leurs teneurs est de 80, 70 et 60 mg EQ/g Q (équivalent de quercétine par gramme d'extrait) dans les trois extraits respectivement. Les tanins sont estimés en utilisant la méthode colorimétrique en présence d'acide sulfurique, leurs teneurs est de 122, 137 et 222 mg EQ/g C (équivalent de la catéchine par gramme d'extrait) dans les trois extraits respectivement. L'activité antioxydante évaluée en utilisant la technique de réduction du radical libre DPPH est la plus élevée dans l'extrait éthanolique, par contre elle est faible pour les deux autres extraits. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur 11 souches microbiennes (cinq *Candida albicans*, une *Staphylococcus aureus*, deux *Enterococcus faecalis*, une *Streptococcus mutans*, une *Streptococcus salivarius* et une *Streptococcus constellatus*), selon la méthode de diffusion de disque. Les résultats indiquent que les trois extraits possèdent une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées.

Mots clés : *Punica granatum*, Polyphénol, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne

Abstract

Among the medicinal plants that make up the vegetation cover is the genus *punica*, which is widely distributed mainly in semi-arid regions. Many species of this type are used in traditional medicine because they contain several molecules with therapeutic activities, among the best known species being *Punica granatum*. The organic extracts of the latter were obtained by maceration using three solvents: ethanol, methanol and acetone. The respective yields are: 15,113%, 33,913% and 56,9%. The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, it was 200, 180 and 80 mg Eg AG / g (equivalent of gallic acid per gram of extract) in the three ethanol, acetone And methanol respectively. The flavonoids were evaluated using the AlCl₃ method, their contents being 80, 70 and 60 mg EQ / g Q (quercetin equivalent per gram of extract) in the three extracts respectively. Tannins are estimated using the colorimetric method in the presence of sulfuric acid, their contents being 122, 137 and 222 mg EQ / g C (equivalent of catechin per gram of extract) in the three extracts respectively. The antioxidant activity evaluated using the free radical reduction technique DPPH is the highest in the ethanol extract, but it is low for the other two extracts. Antimicrobial activity was determined on 11 microbial strains (five *Candida albicans*, one *Staphylococcus aureus*, two *Enterococcus faecalis*, one *Streptococcus mutans*, one *Streptococcus salivarius* and one *Streptococcus constellatus*), according to the disk diffusion method. The results indicate that the three extracts possess antimicrobial activity on all the strains tested.

Key words: *Punica granatum*, Polyphenol, Antioxidant activity, Antimicrobial activity

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc. L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *punica*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Punica granatum*. Cet arbre largement utilisée pour traiter les troubles digestives a constitué le sujet de plusieurs études qui ont déterminé leurs compositions chimiques (**Pascual *et al.*, 1984 ; Fleuriet *et al.*, 2005**), ainsi que les propriétés biologiques .

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

Introduction

Ce manuscrit comprend un premier chapitre décrivant d'une part les différentes classes de polyphénols ainsi que leurs propriétés notamment antioxydante. Et d'autre part une description générale du fruit *Punica granatum* (grenade).

Le deuxième chapitre présente les souches microbiennes testées dans le cadre de ce travail. Ensuite la partie pratique comprend le dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins, ainsi l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits des écorces de la grenade à différentes concentrations. Un troisième chapitre va décrire les principaux résultats obtenus ainsi que la discussion.

Partie I les polyphénols : structure et propriétés antioxydantes

1- Classification des composés phénoliques

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

1-1-Acides phénols et les coumarines

1-1-1-Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotova *et al.*, 2003). Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont principalement présents dans la grenade par la présence de l'acide gallique et l'acide ellagique (Amakura *et al.*, 2000).

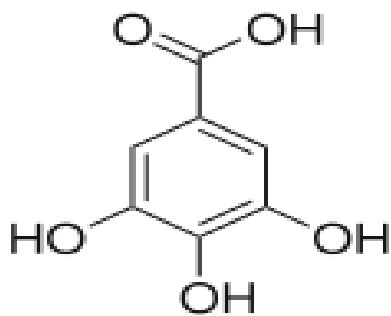


Figure n°01 Acide gallique

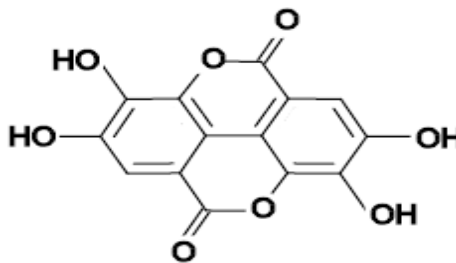


Figure n°02 Acide ellagique

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (**Guignard, 1996**) et les dérivés de l'acide cinnamique (**Malagas, 1992**). La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents (**Fleuriet et al., 2005**). Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides phydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques ont des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, il est rencontré dans la nature surtout sous forme de dimère (**Ribereau-Gayon, 1968**).

1-1-2- Acides cinnamiques

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

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

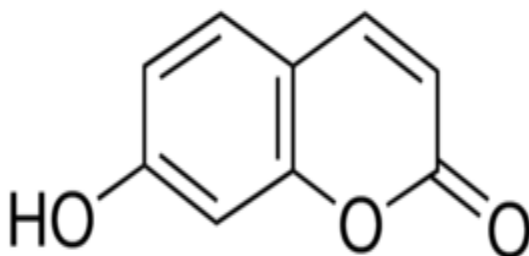


Figure n°03 l'umbelliférone

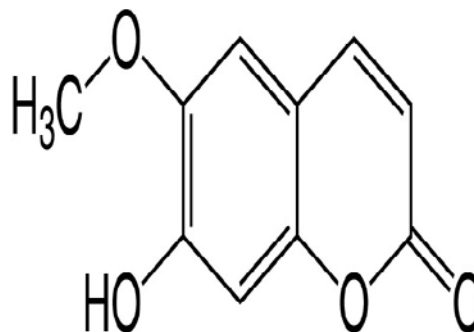


Figure n°04 scopolétine

1-2- Flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin flavus : jaune) sont des substances généralement colorées répandues chez les végétaux ; elles sont trouvées dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guigniard, 1996).

Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire (Gabor, 1988). Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃ (Bruneton, 1999).

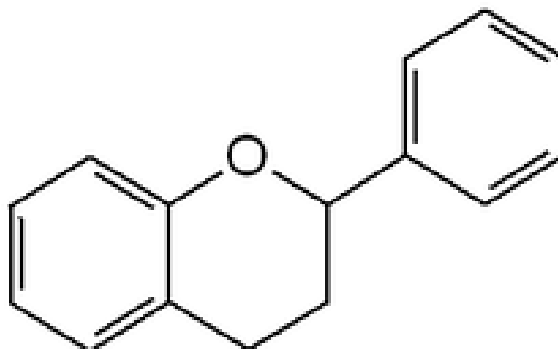


Figure n°05 Squelette de base des flavonoïdes .

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

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graine et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus, comme par exemple les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties

externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuance jaune et orangée). De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical pour leurs activités antivirales, anti tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anticancéreuses (**Meddleton et Kardasnam, 1993**). La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (**Medic-Sanic et al., 2004**).

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

1-2-1-Flavonols

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

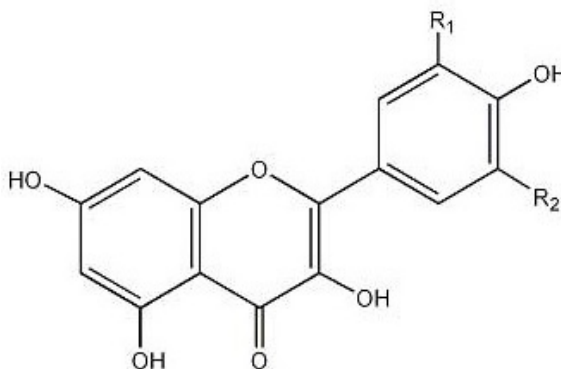


Figure n°06 squelette de Flavonols

1-2-2-Anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et Kuanos, bleu violet) est un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés (**Guignard, 1996**). Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capable d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (**Brouillard, 1986**).

Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu, elles donnent de la couleur aux fleurs et aux fruits, et elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau (**Harbone et Grayer, 1988**).

Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, nous trouvons également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle. Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3 (**Ribereau-Gayon, 1968**). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule, L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment .

1-3- Tanins

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

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tanins hydrolysables, esters des acides-phénols et de glucose.

2-Méthodes de caractérisation des composés phénoliques

2-1- Dosage des composés phénoliques totaux

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

La méthode la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu. Elle est basée sur la réduction d'un mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique (réactif de Folin-

Ciocalteu) en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Singleton et Rossi, 1965).

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

La méthode de dosage la plus largement utilisées pour séparer les composés phénoliques est la séparation par CLHP souvent en phase inverse (la plus utilisée étant l'octadecylsilice ou C18. Les gradients d'élution comportent en général des proportions croissantes de méthanol ou d'acéton nitrile dans de l'eau acidifiée par de l'acide formique ou acétique. Les composés sont élues par ordre de polarité croissante : les acides hydroxycinnamiques sont donc généralement élues avant les flavonoïdes. Pour ces derniers, les aglycones sortent généralement après leurs dérivés glycolyses La détection est basée sur l'absorption caractéristique des poly phénols dans l'UV (Robards et al., 1999).

3-Pouvoir antioxydant des polyphénols

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants (Laughton et al., 1989) qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante Les groupes hydroxyles des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une plus grande stabilité chimique que le radical initial.L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation.Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ionique simpliqués dans la production de radicaux libres Cependant,les composés phénoliques peuvent agir comme des prooxydants (Spiller, 2007) .

Partie II : la grenade (Punica granatum)

1-Historique

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontané depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant JC. (**amourettiet , 1992**). Les nomades arabes, dans leurs transhumances, en ont facilité la dissémination. En effet, en raison de la résistance de son écorce, qui en fait un fruit de longue conservation et peu susceptible d'être altéré durant le transport, la grenade a constitué, très tôt dans l'histoire, un des aliments de base des voyageurs et des caravaniers. D'autant plus que sa pulpe gorgée d'eau et légèrement acidulée permettait d'étancher la soif durant les longues traversées du désert.

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

La grenade porte le nom de pomme punique, c'est le *Malum punicum* de Pline, ou pomme de Carthage. Elle sera alors renommée *Punica granatum*. *Punica* en souvenir des guerres puniques ou peut-être pour puniceus qui signifie rouge écarlate en latin, et *granatum* pour la multiplicité des graines contenues dans le fruit. (**Lemoine, 1998**).



Figure n°07 Arbre du *punica granatum*

2-Taxonomie et nomenclature

L'espèce *Punica granatum* est mieux connue sous le terme de grenadier. Cependant, dans la culture française, cet arbre s'est vu attribuer d'autres noms vernaculaires, moins courants. Ainsi, grenadier est synonyme de : - Balaustier - Miouganier - Arosse - Granatier - Migranier - Miougranié – Baloufié. De même, la fleur du grenadier est également appelée balauste (**Planchon et Collin, 1875**).

Aussi, le fruit, la grenade, porte quelque fois le nom de : - Pomme vénitienne - Pomme grenade - Pomme de Carthage - Balauste - Miougane - Arosse - Granate - Migrane Quant au mot malicorium, il désigne l'écorce du fruit du grenadier. (**Planchon et Collin, 1875**)

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Telle est cette classification :

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica granatum</i>

Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est :

Embranchement	Angiospermes
Sous embranchement	Dicotylédones vraies
Classe	Rosidées
Ordre :	Myrtales
Famille :	Lythraceae
Genre :	<i>Punica</i>
Espèce :	<i>Punica granatum</i>

Il convient donc de retenir que dans cette nouvelle classification, la famille des Punicacées n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des Lythracées, famille comportant 30 genres et 600 espèces (Spichiger et al., 2004) .

3-Le genre *Punica*.

Que ce soit dans la classification de Linné ou dans la classification APGII, le genre *Punica* ne possède que deux représentants : *Punica granatum*, d'une part, et *Punica protopunica*, d'autre part. Ce dernier est recensé exclusivement sur l'île de Socotra ou Socotora, située dans l'océan Indien, au large des côtes de Somalie.(Courechet, 1879).



Figure n°08 Arbre de *punica protopunica*



Figure n° 09 Arbre de *punica granatum*

4-Répartition géographique du grenadier.

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

5-Etude botanique

5-1-Description générale du grenadier

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée. (**Garnier et al., 1961**).

5-2-Les feuilles

Les feuilles du grenadier sont opposées. Elles peuvent avoir une disposition alterne sur les rejets ou être en touffes sur les pousses courtes. Elles sont glabres sur les deux faces. La face supérieure est vert foncé et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante. (**Godet, 1991**). Elles ne possèdent pas de stipule (**Garnier et al., 1961**).



Figure n°10 Les feuilles du *punica granatum*

5-3-Les fleurs

Les fleurs du grenadier portent également le nom de balaustes. (**Planchon et Collin, 1875**). Elles sont très ornementales. Les fleurs rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé (**Garnier et al., 1961**) .



Figure n°11 Les fleurs du *punica granatum*

5-4-Le calice

Le calice est formé de 4 à 8 sépales courts, charnus, épais, d'une belle couleur rouge vif, persistants, d'abord dressés puis étalés après la fécondation. (**Garnier et al., 1961**) .

5-5- La corolle

La corolle comprend 4 à 8 pétales minces alternant avec les sépales. Ces pétales sont généralement très colorés, souvent d'un rouge orangé vif, mais pouvant prendre de nombreuses autres teintes selon les variétés, tel que blanc, jaune pâle, crème ou saumon. Ils ont un aspect chiffonné (**Garnier et al., 1961**) .



Figure n°12 La corolle du *punica granatum*

5-6-Le gynécée

Le gynécée est formé de 8 ou 9 carpelles soudés au tube du calice, disposés sur deux verticilles. L'ovaire, infère, est surmonté d'un style conique terminé par une tête stigmatique (**Garnier et al., 1961**).

5-7 Les étamines

Les étamines, libres et très nombreuses, tapissent la paroi interne du réceptacle floral, à partir de la corolle. (**Courchet, 1897**).

5-8-Les fruits

La grenade, est une baie ronde, cortiquée, c'est-à-dire à épicarpe cutinisé et dur, de la taille d'une pomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre. (**Gazin, 1868**). Ce fruit, très coloré, généralement de couleur rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau de teinte blanc jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé. Cette baie est surmontée des restes du calice, formant une couronne dentée, qui la rend facilement identifiable (**Bruneton, 1999**).



Figure n°13 Les fruits de grenade

5-9- Les graines

Cette baie renferme de nombreuses graines contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et membraneuses. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit. (**Bartels, 1998**).



Figure n°14 Les grains de *punica granatum*

5-10-L'écorce du fruit

L'écorce du fruit du grenadier est également appelée malicorium. Il s'agit de la partie dure du fruit. Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtres sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées. Ces fragments sont de consistance coriace. Ils sont formés d'un parenchyme de cellules à parois minces, au milieu desquelles on distingue des groupes de cellules pierreuses et des faisceaux fibro-vasculaires (Planchon et Collin, 1875). La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente.



Figure n°15. L'écorce du fruit.

5-11- L'écorce de la racine

L'écorce de la racine se présente sous forme de fragments irréguliers, plus ou moins enroulés ou cintrés, d'un millimètre d'épaisseur environ. La face externe gris jaunâtre ou brunâtre montre de larges écailles subéreuses, des rides ou de larges fissures.

La face interne jaune verdâtre est lisse et finement striée longitudinalement. La section jaune clair est nette et montre de fines stries transversales et radiales correspondant au liber (**Garnier et al., 1961**).

5-12-L'écorce de la tige

L'écorce de la tige se présente généralement en fragments tuyautés ou cintrés, plus long que ceux de la racine, à surface externe soit lisse et intacte, soit rugueuse et crevassée, pourvue de nombreuses lenticelles arrondies. Les plaques subéreuses minces sont plus petites que dans la racine (**Garnier et al., 1961**).

6- La culture du grenadier

Le grenadier est un petit arbuste à longue durée de vie, bien adapté au climat méditerranéen et aux zones arides. Il est très résistant et s'acclimata très bien dans de nombreux milieux. Cependant, respecter au mieux ses exigences assurera au grenadier une bonne croissance et une bonne fructification (**Garnier et al., 1961**).

7-Utilisation thérapeutique

Le grenadier a été utilisé depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques. En médecine Ayurvedique, le grenadier est considéré comme « une pharmacie en soi » et il a été utilisé comme agent antiparasitaire, un « tonique sanguin » et pour traiter les aphtes, les diarrhées et les ulcères. Le grenadier a servi aussi de remède pour le diabète dans le système Unani de la médecine pratiquée au Moyent Orient et en Inde (**Jurenka, 2008**).

Les propriétés thérapeutiques potentielles du grenadier sont très variées et incluent traitement et prévention du cancer, les maladies cardiovasculaires, diabète, dysfonctionnement érectile et protection contre les radiations ultraviolettes. Ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydantes, anticarcinogénique, anti-inflammatoire et antidiabétique du grenadier (**Jurenka, 2008**).

8-Toxicité des composés phénoliques de la grenade

La grenade est largement consommée par de nombreuses civilisations depuis des milliers d'années, et aucun incident n'est signalé et donc elle ne représente aucun danger pour la santé humaine. Cependant, la consommation de la décoction de l'écorce de l'arbre et aussi du péricarpe du fruit peut provoquer une toxicité qui reste à confirmer. Cette toxicité se manifeste par une inflammation sévère aiguë de l'estomac et même la mort de la personne, cela est dû à la présence des tanins et des alcaloïdes à la fois (**Squillaci and Di Maggio, 1986**).

Une autre étude élaborée par **Vidal et al. (2003)** a montré que les Extraits phénoliques de fruits entiers causent une congestion des organes internes et une élévation de la créatinine in vivo. L'huile de pépins de grenade n'était pas toxique pour les larves de crevettes de saumure (**Fatope et al., 2002**), mais des réactions allergiques graves et cancer d'œsophage (**Hegde et al., 2002**) suite à une consommation très élevée de grain de grenades (**Ghadirian et al., 1992**) ont été mentionnés. Le jus de grenade contient des taux élevés en polyphénols (e 2 g/L), et il était considéré comme aliment toxique pour le bétail, une étude a été réalisée sur des rats Sprague-Dawley pour évaluer la toxicité potentielle de ces composés via un régime enrichi en punicalagine à une concentration de 6% administré sur une période de 37 jours. La quantité d'aliments ingérés, l'index d'utilisation alimentaire et le taux de croissance sont plus faibles chez les rats traités durant les 15 premiers jours sans effet toxique significatif. Cela pourrait être dû à la plus faible valeur nutritionnelle de la ration enrichie en punicalagine ainsi qu'à sa faible appétence. Aucune différence significative n'a été observée lors des analyses de sang sauf pour l'urée et les triglycérides qui sont restés à des valeurs faibles durant toute l'expérience. L'analyse histopathologique du foie et des reins a confirmé l'absence de toxicité (**Cerdá et al., 2003**).

1- *Staphylococcus aureus*

1-1-Définition et classification du *Staphylococcus aureus*

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

En 2001, les chercheurs Garrity et Holt ont proposé de radier les *S. aureus* de la famille des Micrococcaceae (genre *Micrococcus* et *Stomatococcus*) grâce l'analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) ainsi que d'autres analyses génétiques (Dworkin, 2006).

Sa position taxonomique est maintenant bien définie et il a une famille à son nom : Staphylococcaceae (Dworkin, 2006).

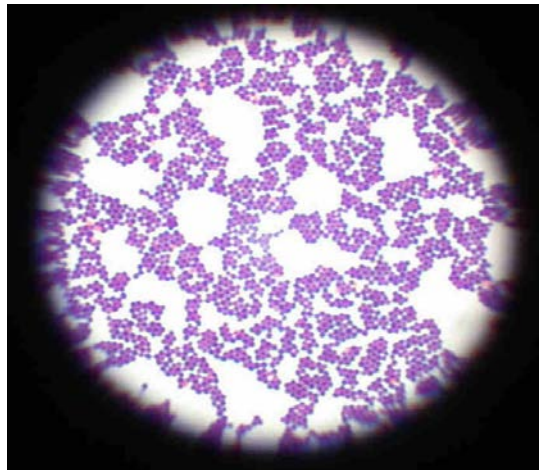


Figure n° 16 Observation microscopique de *Staphylococcus aureus*

1-2-Habitat

1-2-1-Chez l'être vivant

S. aureus fait partie de la flore commensale normale des mammifères et des oiseaux, à l'inverse de certaines espèces de staphylocoques qui ont, eux un hôte préférentiel. *S. aureus* semble capable de coloniser tous les mammifères (marins et terrestres) même si différents biotypes de souches de *S. aureus* pourraient être raccordés à des hôtes spécifiques. Par exemple, selon une étude de 2003, un biotype dit « abattoir » serait associé aux produits de boucherie et au personnel des unités de production des abattoirs (Hennekine et al., 2011).

Chez l'homme, *S. aureus* est présent sur plusieurs sites corporels. On le repère sur la surface de la peau et des muqueuses, mais il colonise principalement les fosses nasales, les glandes de

la peau, le cuir chevelu, les mains, la bouche, les dents et le périnée (Kloos et al., 1976 ; Williams et al., 2005).

1-2-2-Dans l'environnement

Le *S. aureus* est une bactérie qui est répandue sur la planète de façon ubiquitaire. Il possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux. (Dworkin et al., 2006).

1-2-3- Dans les aliments et leur environnement de production

La bactérie peut se retrouver dans les aliments comme par exemple, le lait, les produits laitiers ou la viande. La contamination des aliments peut être due principalement à la matière première qui est contaminée ou d'origine humaine lors de la fabrication et/ou le conditionnement de l'aliment dans l'industrie agro-alimentaire (Callon et al., 2007).

Ces contaminations sont souvent liées à un défaut d'hygiène du matériel de production ou de l'employé. (Ikeda et al., 2005).

1-3-Pouvoir pathogène

Les Staphylocoques sont responsables chez l'homme, d'infections qui peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané ; elles peuvent aussi diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique avec un polymorphisme symptomatique extrême. (Asao et al., 2003).

2- *Candida albicans*

2-1-Définition

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (Chu *et al.*, 1993) se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (Graser *et al.*, 1996) formant ainsi des colonies blanches crémeuses.

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire (Buffo *et al.*, 1984).

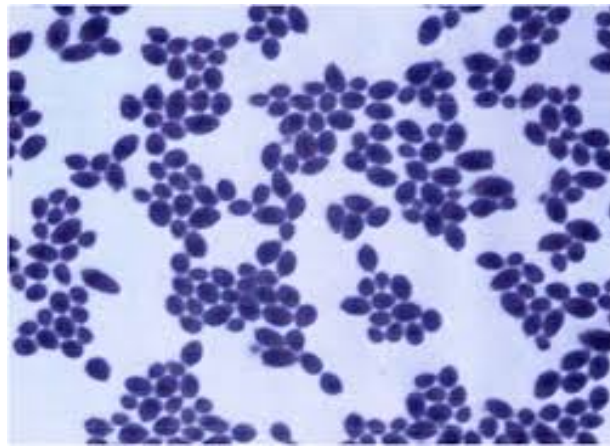


Figure n° 17 Observation microscopique de *Candida albicans*

2-2-Habitat

Candida albicans est un champignon cosmopolite dont les fréquences d'isolement montrent que chez des sujets sains la levure se répartit différemment en fonction des sites de prélèvement : peau (3%), vagin (13%), tractus ano-rectal (15%), cavité buccale (18%), estomac et duodénum (36%), et jéjunum et iléon (41%). Le réservoir principal est donc le tube digestif où la fréquence de portage varie selon les sujets (Mavor *et al.*, 2005).

2-3-Pouvoir pathogène

De nombreux facteurs de virulence sont associés à la pathogénèse de *C. albicans* dont les principaux sont les adhésines, des biomolécules favorisant l'adhérence aux cellules de l'hôte, et les protéases aspartiques et les phospholipases, des enzymes hydrolytiques sécrétées par la levure (Calderone et Fonzi, 2001).

De plus, la transition morphologique et la commutation phénotypique jouent aussi un rôle important dans la virulence de ce pathogène (**Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009**).

Tous ces facteurs ne semblent pas pouvoir supplanter les défenses de l'hôte normal, mais permettent plutôt au pathogène de coloniser les muqueuses. Par contre, chez les patients immunosupprimés, l'équilibre dynamique entre les mécanismes de défense de l'hôte et la levure tourne en faveur de cette dernière, notamment dû à la présence de ces facteurs (**Odds *et al.*, 1988**).

3- *Enterococcus faecalis*

3-1-Définition

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes et dont le génome contient un faible pourcentage en G+C (37,5 à 44 %). Ce sont des organismes anaérobies aérotolérants, oxydase et catalase négatives bien que le gène codant cette dernière enzyme de détoxification existe dans leur génome (**Paulsen et al., 2003**).

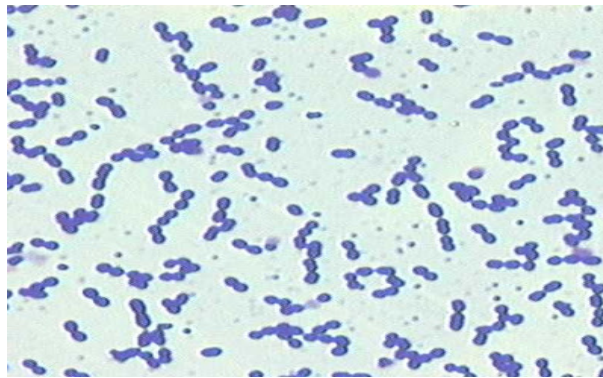


Figure n° 18 Observation microscopique d'*Enterococcus faecalis*

3-2-Habitat

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes, présentes dans différentes niches écologiques telles que l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud (10⁵-10⁸ UFC/g de matière fécale), plus rarement dans le vagin ou la cavité buccale (On les retrouve également dans les eaux usées, l'eau douce, l'eau de mer, le sol, sur les végétaux et chez les insectes. Plus exceptionnellement, leur présence est signalée dans le tractus intestinal des animaux à sang froid (batraciens, reptiles et insectes (**Flahaut et al., 1997**).

De nombreuses études ont établi que *faecalis* est l'espèce la plus communément retrouvée parmi les entérocoques. Ainsi, disséminé avec les excréments humains, les déjections animales et les déchets domestiques, *E. faecalis* se retrouve dans l'environnement immédiat de l'homme. En raison de ses capacités de résistance, cette bactérie est communément utilisée comme indicateur de contamination fécale afin de tester la qualité hygiénique des échantillons environnementaux (**Flahaut et al., 1997**).

3-3-Pouvoir pathogène

Considérés comme anodins il y a une vingtaine d'années, les entérocoques sont maintenant clairement identifiés comme une des causes majeures d'infections nosocomiales. Ils font partie des pathogènes nosocomiaux les plus communs, et sont responsables d'infections urinaires ou intra-abdominales, d'abcès viscéraux, de pneumonies, de septicémies, d'endocardites et de méningites (**Flahaut *et al.*, 1997**).

Aux Etats-Unis, les entérocoques sont le troisième genre bactérien isolé lors de bactériémies et la seconde cause d'infections nosocomiales). C'est aussi le genre le plus souvent cité lors d'infections de plaies chirurgicales dans les unités de soins intensifs. En France, d'après une étude publiée récemment portant sur 15803 cas d'infections nosocomiales, les entérocoques ont été identifiés comme responsables de 6,4 % des cas, ce qui leur confère le cinquième rang. Sur 641 souches d'entérocoques identifiées, 3,1 % présentaient une résistance à la vancomycine, représentant moins de 0,01 % de la totalité de ces infections en France. La facilité avec laquelle les entérocoques acquièrent des résistances à des antibiotiques, couplée à leur capacité de survie dans l'environnement, les rend spécialement adaptés pour devenir des pathogènes opportunistes. L'accroissement des populations sensibles, l'augmentation de la durée d'hospitalisation et la large utilisation des antibiotiques participent aussi à ce phénomène. Les infections à entérocoques peuvent provenir de nombreuses sources, comme les cathéters intraveineux, urinaire ou biliaire, les corps étrangers, les plaies chirurgicales ou encore Viala cavité buccale. Certaines études ont aussi montré que les entérocoques pouvaient être transmis par les mains du personnel soignant, le matériel clinique ou encore de patient à patient (**Chenoweth, 1990**).

4- *Streptococcus mutans*

4-1-Définition

Streptococcus mutans est une bactérie cocciforme de type Gram positif. Elle fait partie de la flore commensale de la cavité buccale. Il s'agit de la bactérie la plus souvent en cause dans les caries dentaires (Ajdic et Pham, 2007). *Streptococcus mutans* ne signifie pas forcément caries. Celles-ci seraient la conséquence du régime alimentaire, principalement le saccharose, qui engendre une acidité ainsi qu'une production de glucanes insolubles dans l'eau (par la présence de *Streptococcus mutans*), puis fragilise l'émail dentaire avec la formation d'un biofilm, entraînant une virulence des *streptocoques mutants* (Ajdic et Pham, 2007).

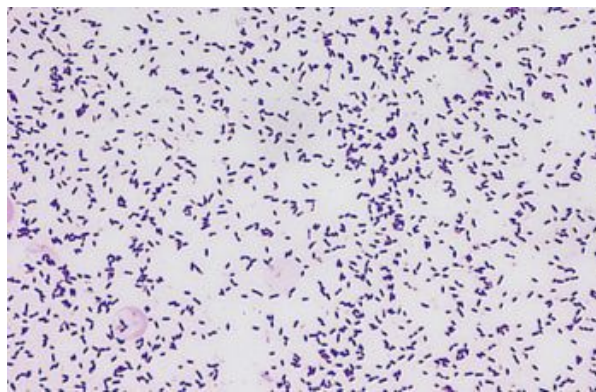


Figure n°19 Observation microscopique de *Streptococcus mutans*

4-2-Habitat et pouvoir pathogène

Streptococcus mutans s'installent dans la bouche qu'après la naissance des dents, en plus d'être à la base de la formation des caries, elles sont associées aux endocardites, gingivite... Ce sont des commensaux de la bouche et de l'intestin (Ajdic, Pham, 2007). Ils représentent 30 à 60% de la population bactérienne des surfaces des dents, des joues, de la langue et de la salive. Les dents sont couvertes par la plaque dentaire constituée d'une agrégation de bactéries, de glycoprotéines salivaires, de sels inorganiques et de dextrane à partir du saccharose présent dans l'alimentation. La plaque dentaire adhère à la surface de l'émail des dents et aux gencives ; ces tissus sont perméables aux bioproduits microbiens (acides, antigènes et enzymes) et deviennent vulnérables à l'invasion microbienne. (Ajdic, et Pham, 2007).

La plaque dentaire joue un rôle étiologique prédominant dans la formation des caries et des parodontopathies. Ces liaisons sont à l'origine d'endocardites infectieuses, notamment après des soins ou des extractions dentaires 50 à 60% des endocardites infectieuses sont dues aux streptocoques non groupables (*S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius* et *S. milleri*) (**Ajdic et Pham, 2007**).

5- *Streptococcus .salivarius*

5-1-Définition

S. salivarius est une bactérie Gram appartenant au phylum des Firmicutes et dont le génome présente une faible teneur en bases G et C de 35.7 % à 38.8 % (Tettelin *et al.*, 2002). L'espèce *S. salivarius* est l'une des 113 espèces de streptocoques (Richards *et al.*, 2014).

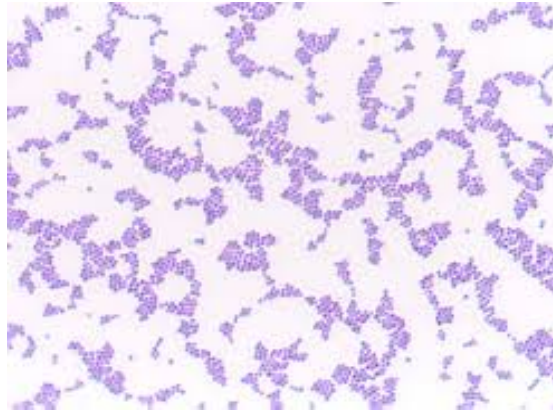


Figure n°20 Observation microscopique de *Streptococcus salivarius*

5-2-Habitat

S. salivarius est une espèce commensale de l'homme. Elle est principalement retrouvée au sein de la salive et dans le biofilm multi-espèces du dos de la langue (Aas *et al.*, 2005 ; Corredoira *et al.*, 2005). Elle est primo-colonisatrice de la cavité buccale mais également du système digestif chez les nouveau-nés (Carlsson *et al.*, 1970 ; Favier *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 1996 ; Park *et al.*, 2005). Elle persiste dans la cavité buccale, l'estomac et les intestins tout au long de la vie (Hakalehto *et al.*, 2011; Van den Bogert *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2005). Ainsi, *S. salivarius* est la 36ème espèce bactérienne la plus fréquemment retrouvée au sein du système digestif (Qin *et al.*, 2010).

5-3-Pouvoir pathogène

Bien que l'espèce *S. salivarius* soit considérée comme commensale, certaines souches sont des pathogènes opportunistes qui provoquent des méningites ou des bactériémies chez des individus affaiblis (Kitten *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2012). Les souches commensales étant incapables de passer les barrières de protection naturelles de l'organisme humain, les pathologies développées font suite à une contamination extérieure par des souches de *S.*

salivarius (Wilson *et al.*, 2012). De simples mesures d'hygiène permettent de contrer ces contaminations, par exemple en portant un masque chirurgical lors d'une opération des méninges pour éviter une contamination via la flore buccale naturelle de l'équipe médicale (Wilson *et al.*, 2012).

Les bactériémies causées par *S. salivarius* présentent les mêmes symptômes cliniques que celles causées par *Streptococcus bovis* chez des patients affaiblis (Corredoira *et al.*, 2005). Toutefois, les bactériémies causées par *S. salivarius* sont minoritaires par rapport aux bactériémies causées par d'autres streptocoques. En effet, Han *et al.* (2006) ont analysé 50 souches de streptocoques responsables de bactériémies et seules deux souches isolées de patients affaiblis par un cancer se sont avérées être de l'espèce *S. salivarius*.

La méningite à *S. salivarius* survient après une opération des méninges et fait suite à la contamination du liquide céphalo-rachidien (Wilson *et al.*, 2012). Les études récentes de Shirokawa *et al.* (2014) montrent que les méningites provoquées par *S. salivarius* peuvent être confondues avec des méningites à *Streptococcus pneumoniae* car les souches de *S. salivarius* impliquées expriment des antigènes ressemblant aux antigènes pneumococaux. Ces données suggèrent que *S. salivarius* possède des antigènes de surface proches de *S. pneumoniae* qui ont pu être acquis par transfert horizontal.

6- *Streptococcus constellatus*

6-1-Définition et habitat

Streptococcus constellatus est une espèce de *Streptococcus* (Jacobs *et al.*, 2000) fait partie de la flore normale dans la cavité buccale, la région urogénitale, et le tractus intestinal. Cependant, il peut souvent causer des infections purulentes dans d'autres parties du corps. Les études d'homologie de l'ADN et l'analyse de la séquence d'ARNr 16S démontrent que *S.constellatus* appartient au groupe *Streptococcus anginosus* (groupe milleri) avec *Streptococcus intermedius* et *Streptococcus anginosus* (Whiley *et al.*, 1992).

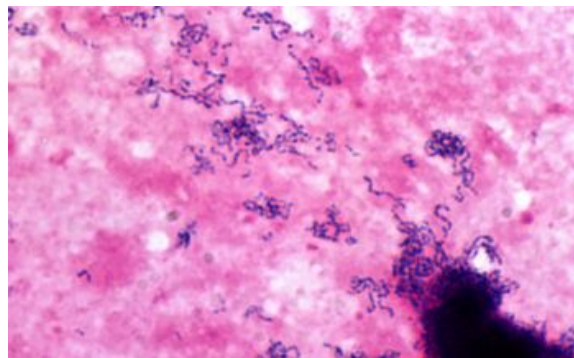


Figure n° 21 Observation microscopique de *Streptococcus constellatus*

6-2-Pouvoir pathogène

La particularité de cette bactérie provient de son pouvoir pathogène aux multiples facettes.

-Angine rouge ou érythématopultacée: elle peut causer une large variété d'infections, allant d'infections localisées non compliquées à des infections invasives.

Autres infections

-Infections non invasives essentiellement cutanées: impétigo, surinfections de plaies ou de brûlures ou muqueuses: otites, sinusites, vaginites ou conjonctivites (Carapetis, 2005).

-Infections invasives: pleuro-pulmonaires, ostéo-articulaires, péritonéales, endophtalmiques, endocarditiques ou cérébro-méningées (Kaplan, 2003).

-Scarlatine: elle se manifeste par une angine associée à une éruption érythémateuse, est liée à la sécrétion d'une toxine érythrogène par des souches de *S.pyogenes* lysogénisées par un bactériophage (Carapetis, 2005)

1- Matériel végétal

La collecte de l'échantillon de l'écorce du fruit de *Punica granatum* a été effectuée en Algérie dans la région de Mostaganem au cours du mois d'octobre 2016. Il a ensuite été séché puis broyé, La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'humidité et de la lumière.



Figure n°22 Les écorces de la grenade après séchage et broyage

2- Analyses phytochimiques

2-1-Préparation de l'extrait d'écorces de la grenade

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération par trois solvants organiques ; il s'agit du méthanol, acétone et de l'éthanol. La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de la matière végétale à extraire. Dans notre cas 5 g de la poudre d'écorces est macérée avec un solvant à raison de 70%.



Figure n°23 extraction de l'extrait d'écorces de la grenades par macération

L'extraction est effectuée sous agitation continue et à une température ambiante, pendant 24 heures. Après filtration sur un papier whatman, les filtrats sont additionnés et concentrés par un rotavaport.

Le même procédé est répété pour les trois types de solvants. Cette série d'extraction a permis d'obtenir trois extraits organiques: extrait du méthanol, extrait de l'acétone et extrait de l'éthanol, qui seront récupérés dans des flacons en verre puis conservés à 4° C jusqu'à utilisation.



Figure n°24 Concentration des filtrats par le rotavaport

2-2-Détermination du rendement

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

$$\mathbf{R = (P1 - P2) / P3}$$

P1: poids du ballon après évaporation

P2: poids du ballon vide

P3: poids de la matière végétale de départ

2-3-Détermination de la teneur en polyphénols totaux**2-3-1- Principe**

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin Cioclateu (Singleton *et al.*, 1999). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Cioclateu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et charpentier, 2006).

2-3-2-Mode opératoire

Dans un tube à essai on a introduit 1ml des différents extraits à différentes concentrations (0,062-0,125-0,25-0,5-1-2mg/ml) et 5ml du réactif de Folin-Ciocalteu à 10%, puis on a homogénéisé la solution à l'aide d'un agitateur vortex. Après quelques minutes, on a ajouté 4ml de la solution de carbonate de sodium, on a agité encore une fois afin d'obtenir une solution homogène. Les solutions ont été laissées incuber à l'ombre et à température ambiante pendant 1 heure. L'absorbance a été mesurée à 765 nm contre un blanc.

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



Figure n°25 Dosage des polyphénols totaux

2-4--Détermination de la teneur en flavonoïdes**2-4-1-Principe**

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Le chlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 420 nm.

2-4-2-Mode opératoire

Un volume de 1ml de chaque extrait est mélangé avec 1 ml de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2%, agitation. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la lecture est faite à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le blanc est constitué par 1ml d'eau distillée mélangé à 1 ml de chlorure d'aluminium réalisé comme précédemment.

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

2-5--Détermination de la teneur en Tanins**2-5-1- Principe**

Selon Price et *al.* (1978) le dosage des tanins se fait par la méthode colorimétrique basée sur la dépolymérisation des tanins condensés en présence d'acide sulfurique. Sous l'effet de la vanilline, ces tanins se transforment en anthocyanidols de couleur rouge spécifique. (Sun et *al.*, 1998).

2-5-2-Mode opératoire

Un volume de 1ml de l'extrait dilué est additionné à 2,5ml de vanilline (1 %) et 2,5 ml d'acide sulfurique. Après 15 min d'incubation à une température ambiante, la lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 500 nm, contre un blanc.

Un standard de calibration a été préparé en utilisant des solutions de catéchine à différentes concentrations allant de 0,05 jusqu'à 0,4 mg/ml



Figure n°26 Dosage des Tannins totaux

3-Evaluation de l'activité antioxydante : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

3-1- Principe

L'activité antioxydante est mesurée par la dégradation du DPPH qui est un radical synthétique présentant, à l'état oxydé, une couleur violette intense. La réduction de cette molécule par la réception de protons à partir de substances antioxydantes induit la disparition de cette coloration dont la dégradation est fonction de la richesse de l'extrait en ces molécules capable d'inhiber ce radical. La cinétique de dégradation de la couleur est déterminée par spectrophotométrie à 515 nm par comparaison à un témoin (sans extrait).

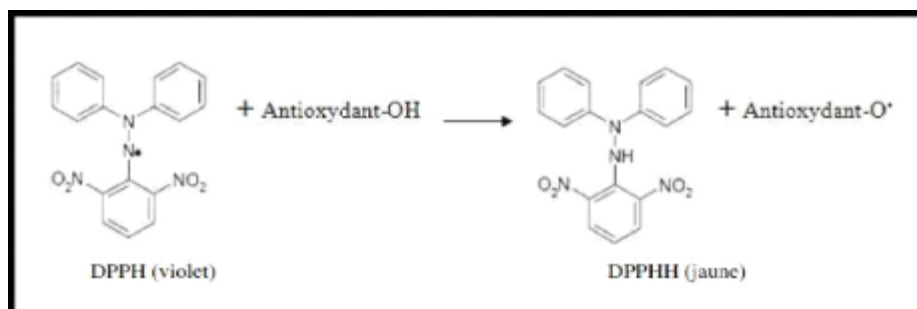


Figure n° 27 la reduction de DPPH de sa forme radicalaire a sa forme ,non radialaire

3-2-Mode opératoire

50µl de chaque solution des extraits à différentes concentrations (0,025- 0,05- 0,1- 0,5- 1- 2- 3- 4- 5 mg/ml) sont ajoutés à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0,0025g/ 100 ml). Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1950 µl de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est mesurée à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibitions calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{DO contrôle} - \text{DO d'échantillon}}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

4-Evaluation de l'activité antimicrobienne**4-1-Les souches microbiennes**

Les souches utilisées pour déceler l'activité antimicrobienne des extraits d'écorces de grenades sont des souches microbiennes prélevées à partir de la cavité buccale de sujets présentant des infections carieuses à l'exception de la souche *staphylococcus aureus* qui a été isolé a partir d'un aliment altéré par cette dernière. L'identité des souches est représentée dans le tableau ci-dessus (Tab n°1)

Tableau n°01 L'identité des souches

Code	Identité
CA1	<i>Candida albicans</i>
CA2c	<i>Candida albicans</i>
CA3	<i>Candida albicans</i>
CA3 ₂	<i>Candida albicans</i>
CA4	<i>Candida albicans</i>
SCMR ₁	<i>Streptococcus mutans</i>
SCR4	<i>Streptococcus salivarius</i>
S5 ₂ C ₂	<i>Streptococcus constellatus</i>
ECA1	<i>Enterococcus faecalis</i>
ECB1	<i>Enterococcus faecalis</i>
SYc4	<i>Staphylococcus aureus</i>

4-2-Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 4°C dans des tubes contenant 10 ml de milieu de culture incliné (Gélose nutritive pour *Staphylococcus aureus*, sabouraud pour *C.albicans*, et M17 pour les streptocoques et entérocoques)

4-3- Vérification de la pureté et de l'identité des souches

4-3-3-La pureté des souches

Les souches sont ensemencés en stries, sur des boîtes de Pétri contenant du M17 pour les streptocoques et les entérocoques et du sabouraud pour *Candida albicans*, gélose nutritive pour *Staphylococcus aureus*. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48 h en anaérobiose et en aérobie selon les souches.

4-3-4-L'identité des souches

A partir de nos cultures pures, nous avons réalisé des observations macroscopiques, microscopiques et un test de la catalase.

Le test macroscopique consiste à étudier à l'œil nu la forme, l'aspect, le contour, la surface, la couleur des colonies sur les milieux M17, Gélose nutritive et sabouraud.

L'étude microscopique des streptocoques, entérocoques et *Staphylococcus aureus* a été réalisés après une coloration de Gram et après coloration simple pour les souches de *Candida albicans*.

Pour mettre en évidence la présence de la catalase, une colonie a été diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase.

4-4-Les milieux de cultures

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants:

- Les géloses nutritives, M17 et sabouraud pour la mise en culture des souches microbiennes.
- La gélose Mueller Hinton et sabouraud pour l'étude de la sensibilité des bactéries et des levures respectivement aux différents extraits d'écorces de grenades.

4-5-L'antibiogramme et L'antifongigramme

C'est la technique de base utilisée pour étudier la sensibilité ou la résistance des souches sous l'effet de différents antibiotique. Des boites de Pétri contenant du milieu Sabouraud (pour *Candida albicans*) et Mueller Hinton agar (pour les bactéries) sontensemencées aseptiquement par une suspension de 0,5 McFarland qui provient d'une culture jeune. L'ensemencement se fait par écouvillonnage. Après le séchage des boites, des disques d'antibiotiques et d'antifongiques (TE,DA,CN, N,CZ,C,AMP,E,LEV,P,VA), spécifiques ont été déposés sur la surface de la gélose. Les boites sont mises à incuber pendant 24 à 48h à 30C° pour *Staphylococcus aureus* et à 37C° pour les autres souches , l'action

inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des disques. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions.

4-6- Méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques)

Des colonies bien isolées à partir de cultures jeunes de 18 à 24h ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de 0.5 McFarland (D.O = 0,08 à 0,1/» = 600 nm).

Par la suite la surface entière de la gélose, Mueller Hinton pour les streptocoques, enterocoques et *Staphylococcus aureus*; Sabouraud pour les levures (*Candida albicans*) a étéensemencée par écouvillonnage par cette suspension microbienne. Des disques stériles imprégnés de 20 et 40mg/ml d'extraits éthanolique méthanolique et acétonique, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Après un temps de repos de 30 min les boîtes ont été incubées 24 à 48 h à 30 et 37 °C en aérobiose pour *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* et en anaérobiose pour les streptocoques et entérocoques.

L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

5-Analyse statistique

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

1-Rendement de l'extraction

La préparation des extraits à partir d'écorces de la grenade a été effectuée par les solvants suivant : méthanol, acétone et éthanol. Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts: l'extrait méthanolique, l'extrait acétonique et l'extrait éthanolique. Exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la poudre d'écorces, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait acétonique 56,9% suivi par l'extrait méthanolique 33,91% et enfin l'extrait éthanolique possède le plus faible rendement avec 15,11%. Les extraits obtenus ont la même couleur et le même aspect (Tab 02.) (Figure 28,29).

Ces résultats sont similaires a ceux rapportés par (Iqbal *et al.*, 2008).

Tab. n° 02: Aspect, couleur et % du rendement des différents extraits d'écorces de la grenade

Extraits	Aspect	Couleur	Rendement %
Ethanol	Pâte collante	Brune	15,11%
Acétone	Pâte collante	Brune	56,9%
Méthanol	Pâte collante	Brune	33,91%

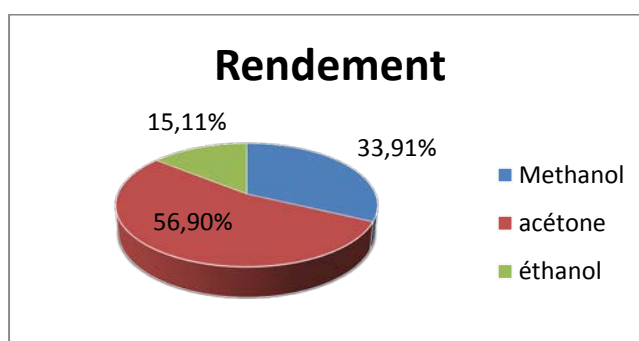


Figure n° 28 Secteur du rendement



Figure n° 29 Le filtrat obtenu avant la concentration par le rotavaport

2- Etude quantitative des composés phénoliques

2-1- Teneur en polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 765 nm. Les résultats obtenus pour l'acide gallique sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation suivante:

$$Y = 15,09x \quad R^2 = 0,993$$

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

À partir de la courbe d'étalonnage, la quantité en polyphénols totaux est de: 200-180 et 80mg EAG/g d'extrait, pour les extraits d'éthanol, d'acétone et de méthanol respectivement.

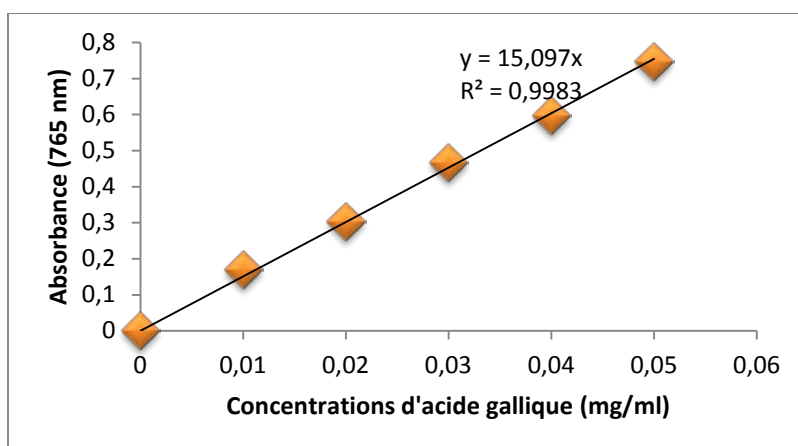


Figure n°30 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (de 10 à 50µg / ml).

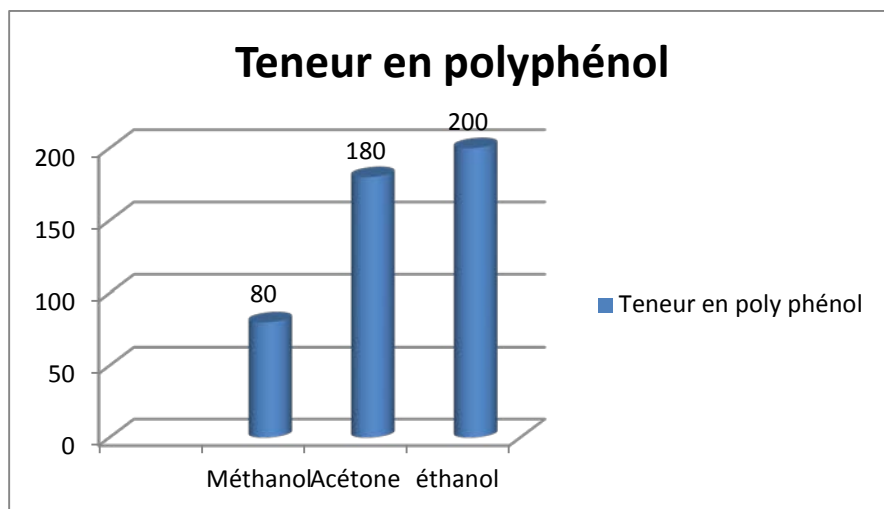


Figure n° 31 Teneur des extraits en polyphénols à une concentration de 2 mg/ml

2-2-Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), la courbe d'étalonnage est celle de la quercétine, l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 420 nm.

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

$$Y = 21,04x \quad R^2 = 0,99$$

À partir de la courbe d'étalonnage, on a mesuré la quantité des flavonoïdes qui est de : 80- 70- 60 mg EQ/g E, pour les extraits d'éthanol, d'acétone et de méthanol respectivement.

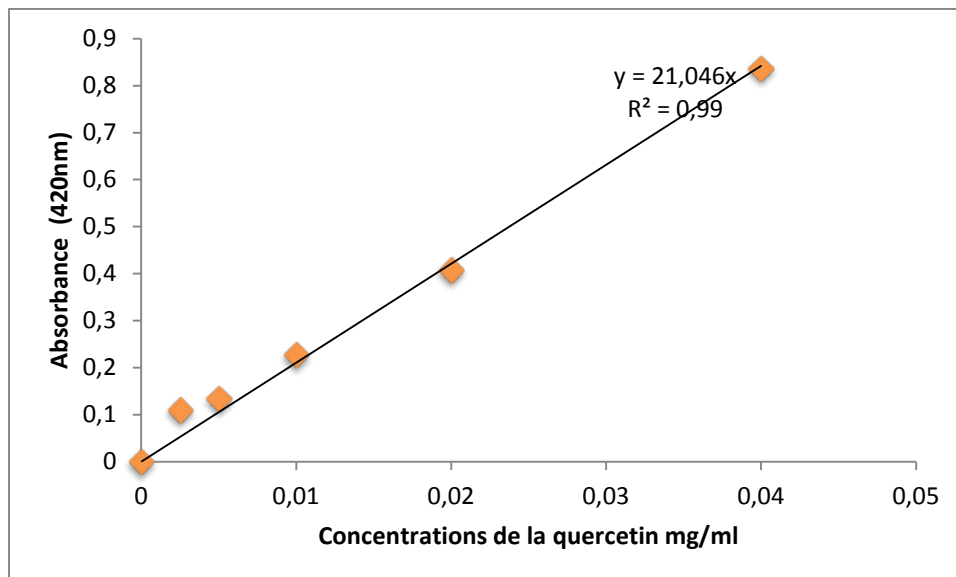


Figure n°32 courbe d'étalonnage de la quercetine (0,0025a 0,04mg /ml)

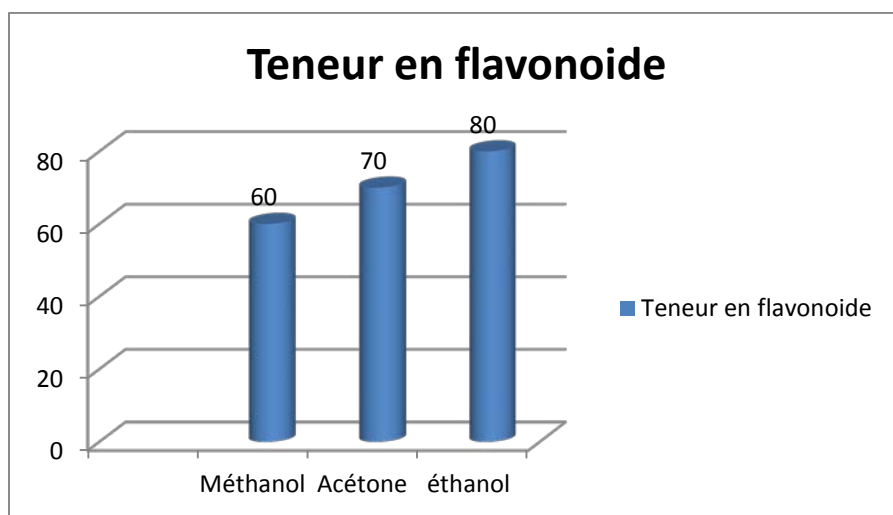


Figure n° 33 Teneur des extraits en Flavonoïdes à une concentration de 2 mg/ml

2-3-Teneur en Tanins totaux

La catéchine a été utilisée comme étalon. L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 500 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

$$Y = 0,369 x \quad R^2 = 0,993$$

La quantité des Tanins a été rapportée en milligramme équivalent de la catéchine par gramme d'extrait. À partir de la courbe d'étalonnage, la quantité des Tanins est de : 220-137 -122 mg EC/g E, pour les extraits d'acétone, d'éthanol et de méthanol respectivement.

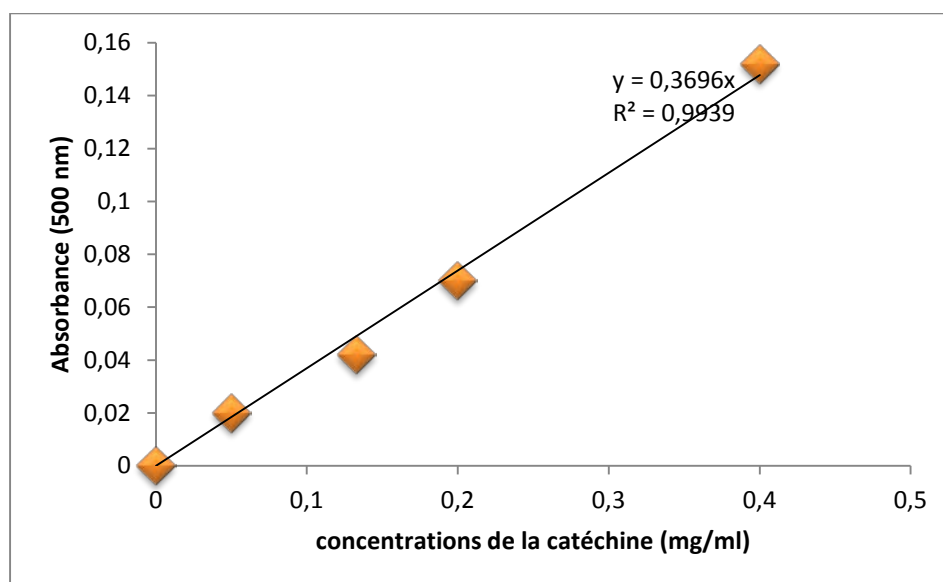


Figure n°34 Courbe d'étalonnage de la catéchine (0,05 à 0,4 mg/ml)

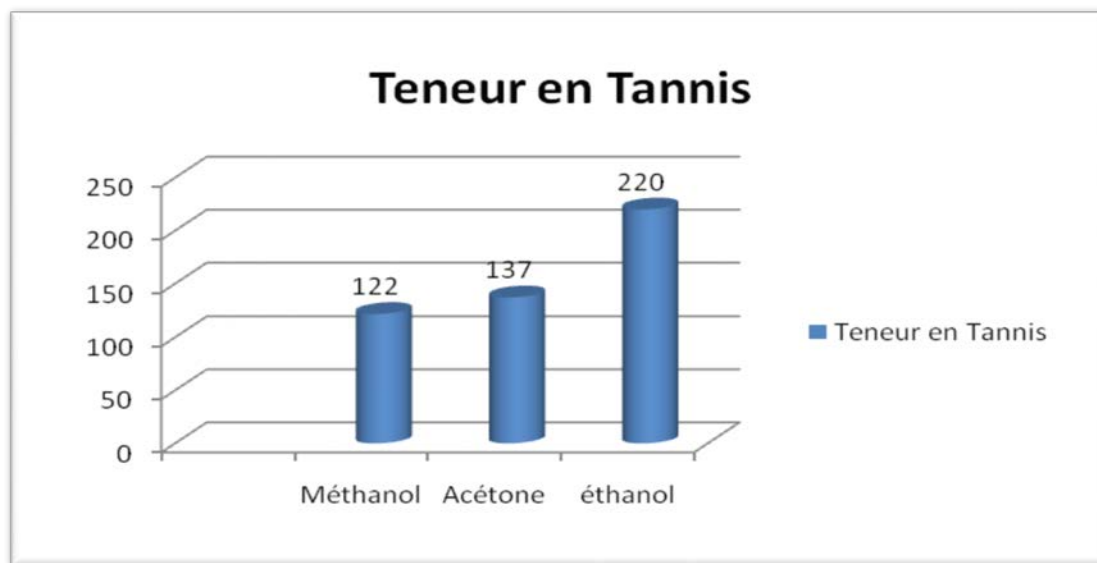


Figure n° 35 Teneur des extraits en Tanins, à une concentration de 2 mg/ml

Les résultats révèlent que les quantités en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins sont les plus élevées dans l'extrait éthanolique suivies de l'extrait acétonique et les plus faibles quantités ont été observées dans l'extrait méthanolique.

(Li et al., 2006) ont rapportés que les flavonoïdes représentent seulement une petite partie des polyphénols présents dans l'extrait et que l'extrait est riche en tanins.

3- Pouvoir antioxydant

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

Les valeurs obtenues (figure n° 36) ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH· en sa forme non radicalaire. À partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations de chaque extrait. Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente.

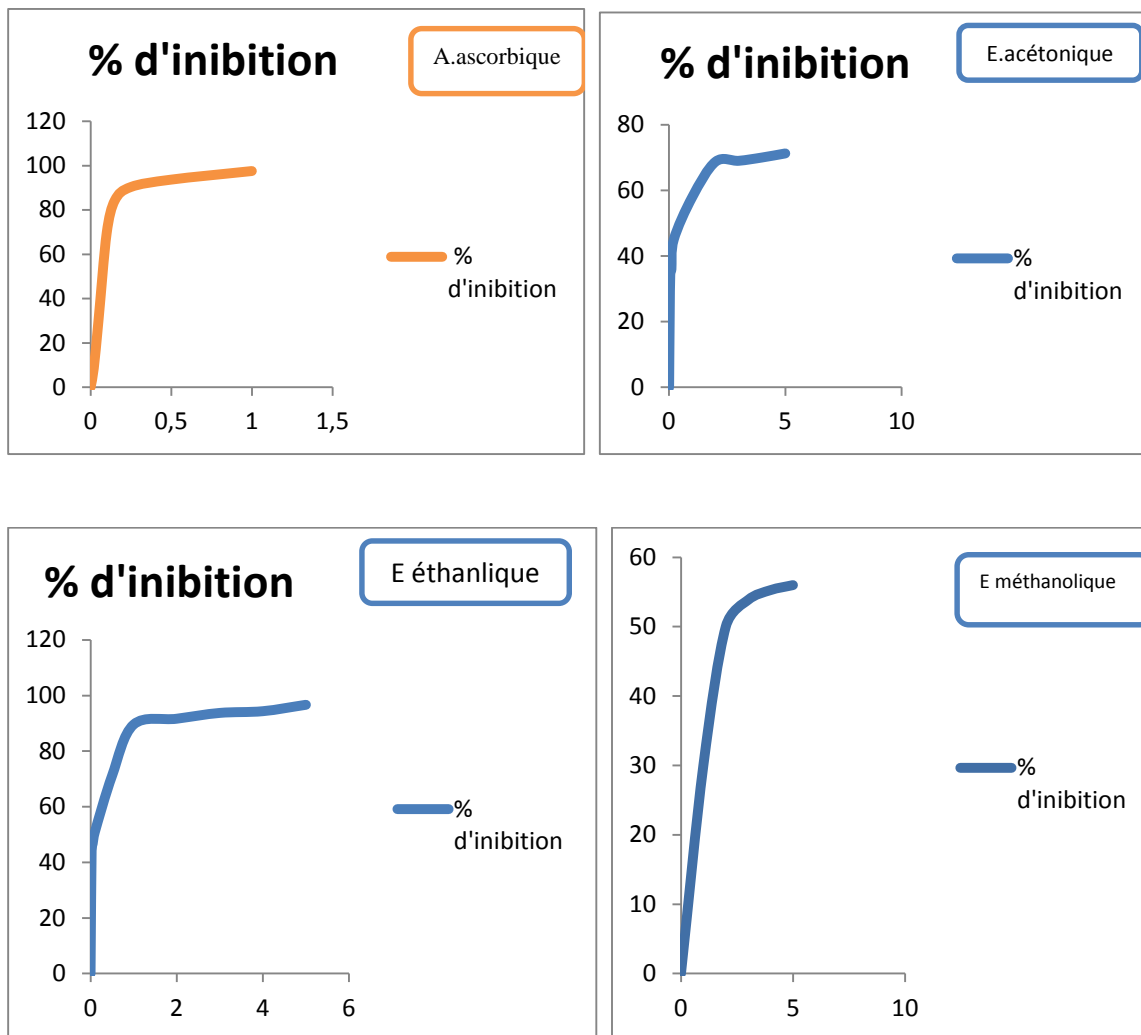


Figure n° 36 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits

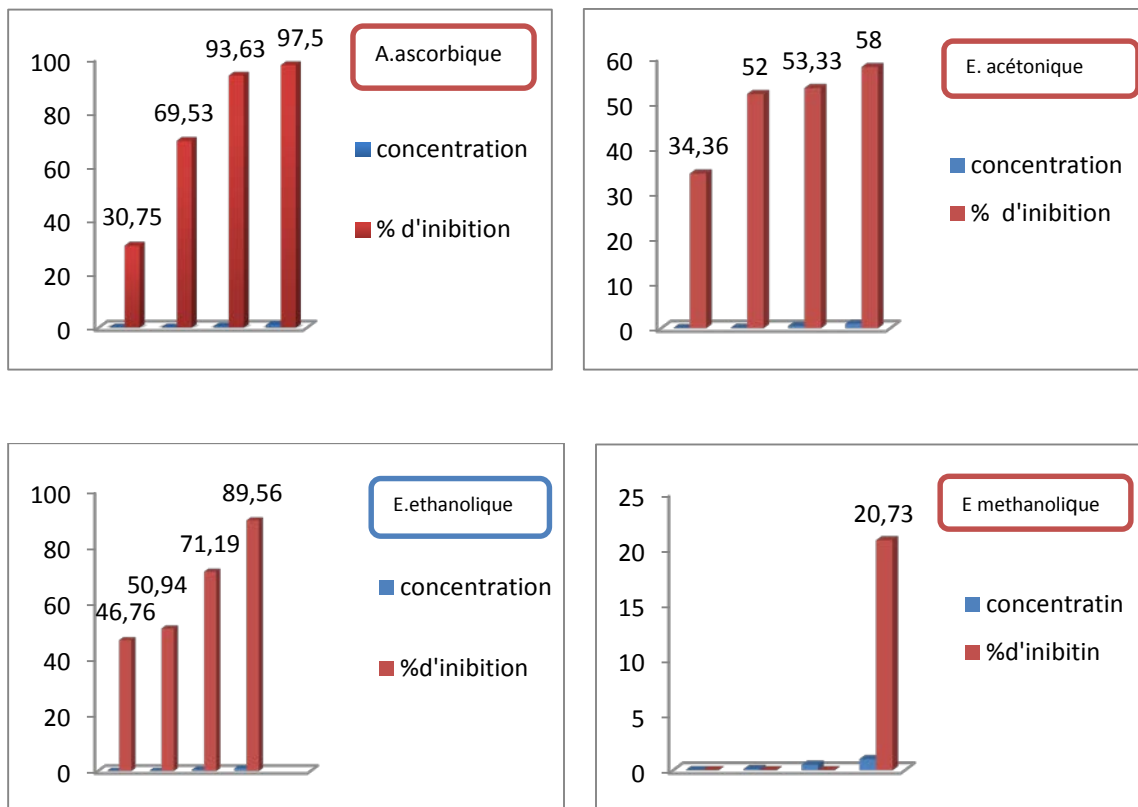


Figure n°37 Pouvoir antioxydant des extraits d'écorces de la grenade

Ainsi l'examen des figures et des histogrammes (figure n° 36 et 37) laisse constater que l'extrait éthanolique et acétonique montrent une grande activité antioxydante dans le test de DPPH tandis que l'extrait méthanolique affiche le plus faible pouvoir inhibiteur.

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

4-Pouvoir antimicrobien

4-1-Confirmation de l'identité et de la purté des souches

Les souhes qui nous ont été fournies sont soumises à quelques tests d'identification dont l'aspect micro et macroscopique.

Dans les conditions favorables à la croissance et après une incubation de 48h à 30 et 37°C dans une atmosphère anaérobique pour les entérocoques et les streptocoques et une atmosphère oxygénée pour *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*, les résultats obtenus de la culture se traduisent par l'apparition des colonies moyenne de 2 à 4 mm de diamètre pour les souches de *C. albicans*. Les colonies ont une coloration blanchâtre crémeuse.

Les colonies de *Staphylococcus aureus* sont des colonies blanchâtres et jaunâtres, lisses rondes et opaque, ont un diamètre entre 1 et 2mm, les colonies des streptocoques sont petites, translucides de contour regulier et de diamètre de 1 a 3mm.

Les colonies d'*Enterococcus faecalis* sont petites de couleur blanche de diametre variant entre 2mm et 3mm .

Coloration de Gram : La coloration de Gram, réalisée à partir des colonies apparues, montre la présence des bactéries à Gram positives. Elles se présentent sous forme de coccis en chainettes pour les streptocoques et les entérocoques et des colonies sous forme de grappe de raisin pour la souche de *Staphylococcus aureus* (Figures n°38,39, ,41)

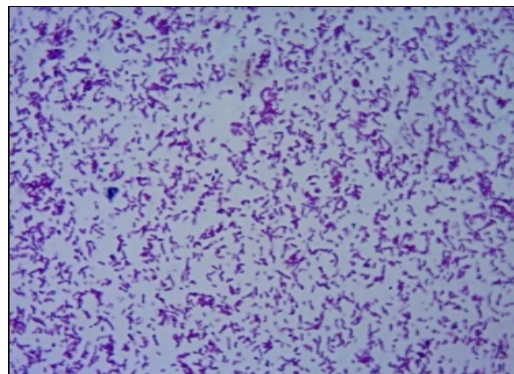


Figure n°38 Observation microscopique de *Streptococcus salivarius*

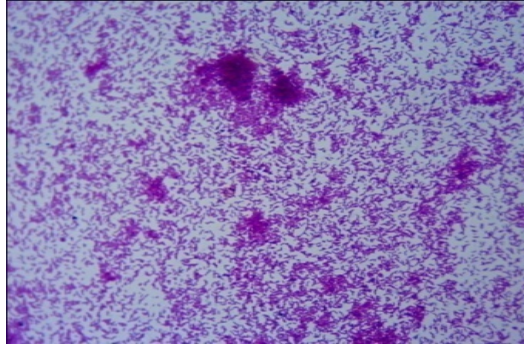


Figure n°39 Observation microscopique d'*Eenterococcus faecalis*

La coloration simple de *Candida albicans* montre la présence de cellules ovales avec présence de quelques bourgeonnements (Figure n° 40)

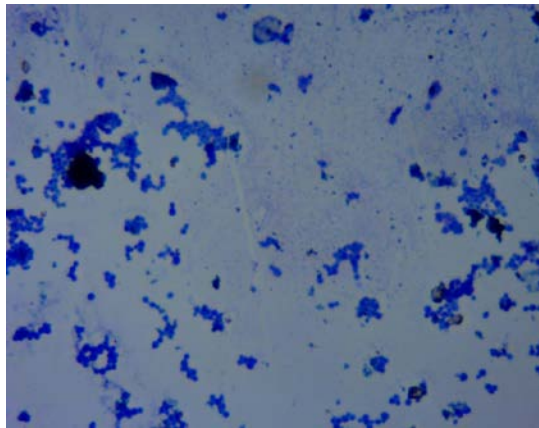


Figure n°40 Observation microscopique de *Candida albicans*

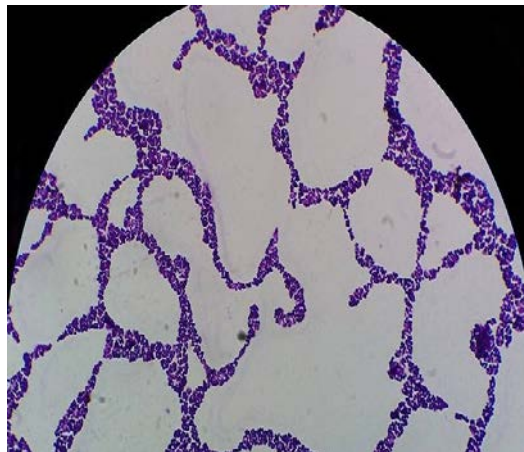


Figure n°41 Observation microscopique de *Staphylococcus aureus*

L'observation microscopique a l'état viable montre que les souches *S. aureus*, *E. faecalis*, les Streptocoques sont des souches immobiles.

L'identification est complétée par la recherche de la catalase, nous avons noté l'absence de cette enzyme chez toutes les souches isolées sauf chez *S. aureus*.

4-2-Effet des extraits de l'écorce de la grenade sur la croissance des souches (la méthode de disques)

La croissance des germes est testé en présence de trois extraits, éthanolique, méthanolique et acétonique, avec une concentration de 20 et 40 mg/ml, sur les *Candida albicans*, les entérocoques, streptocoques et *Staphylococcus aureus*.

Les souches de *C. albicans* sont les plus sensibles, à 40mg/ml les diamètres d'inhibition sont entre 15,5 mm et 33mm et à 20mg/ml les diamètres d'inhibition sont entre 12,5 mm et 25mm pour les différents extraits testés, suivie par *Streptococcus mutans* avec des diamètres variant de 20 mm à 30mm pour les trois extraits et à différentes concentrations, puis *Streptococcus constellatus*, avec des diamètres d'inhibitions variant de 20 à 21 mm, *Streptococcus salivarius* avec des diamètres de 10mm à 30mm, *Enterococcus faecalis* ECA1 avec des diamètres de 14 à 22,5 mm puis *Enterococcus faecalis* ECB1 avec des diamètres variant entre 11 et 20,5 mm suivi par *Staphylococcus aureus* avec les diamètres de 12,5mm 14,5mm et 15,5 mm.

Ces résultats sont en accord avec ceux de (Opara *et al.*, 2009) qui ont rapporté que l'extrait de l'écorce de *Punica granatum* a un effet sur *S. aureus* pour toutes les concentrations.

Les résultats montrent que la majorité des souches microbiennes testées sont sensibles aux extraits de l'écorce de la grenade. Sauf *Staphylococcus aureus* qui est plus au moins résistante à ces derniers. La meilleure sensibilité a été observée chez les souches de *Candida albicans* spécifiquement *Candida albicans* CA2c.

(Cowan .1999) a rapporté que les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique.

L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance microbienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires. (Dhaouadi *et al.*, 2010).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (Essawi et Srour, 2000).

Les tableaux ci-dessous rapportent les valeurs en mm des zones d'inhibitions manifestées par les extraits de la grenade sur les différentes souches étudiées.

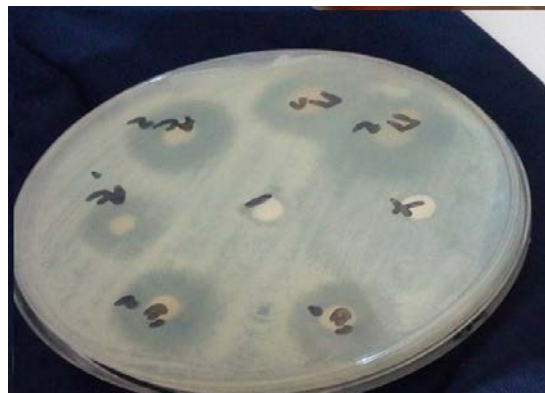
Tab 03. Activité antifongique des extraits d'écorces de la grenade exprimée en diamètre d'inhibition (40mg/ml)

Extraits Souche	<i>C.albicans</i> CA1	<i>C.albicans</i> CA2c	<i>C.albicans</i> CA3	<i>C.albicans</i> CA3 ₂	<i>C.albicans</i> CA4
Ethanol	17,8	18,8	15,5	19	22,25
Méthanol	20,15	33	15	20,15	32
Acétone	17,85	29,45	22	18	30

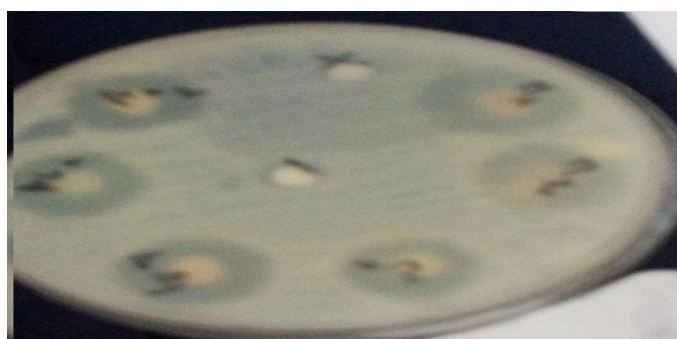
Les diamètres d'inhibitions sont exprimés en mm.



CA1



CA2c



CA4



CA3



CA3₂

Figure n° 42 La sensibilité des souches de *Candida albicans* vis-à-vis des extraits méthanolique, éthanolique et acetonique (40mg/ml)

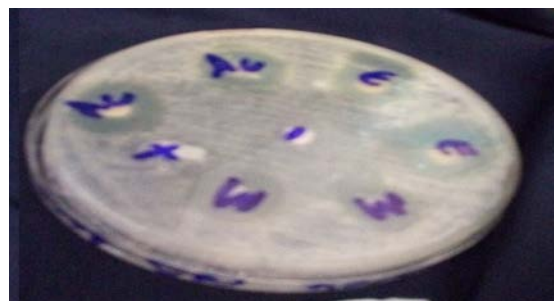
Tab n°4. Activité antifongique des extraits d'écorces de la grenade exprimée en diamètre d'inhibition (20mg/ml)

Extraits / Souches	<i>c.albicans</i> CA1	<i>c.albicans</i> CA2c	<i>c.albicans</i> CA3	<i>c.albicans</i> CA3 ₂	<i>c.albicans</i> CA4
Ethanol	20,5	12,5	22	25	21
Méthanol	13,25	25	17,5	15,5	14
Acétone	15,5	19,5	20	20,75	19

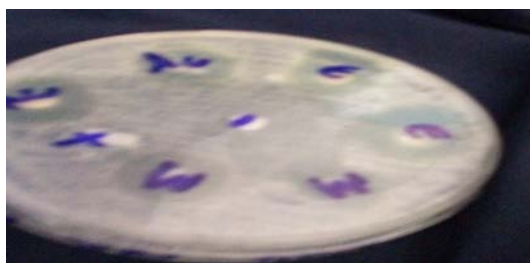
Les diamètres d'inhibitions sont exprimés en mm.



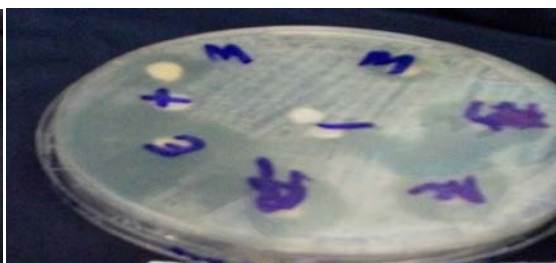
CA1



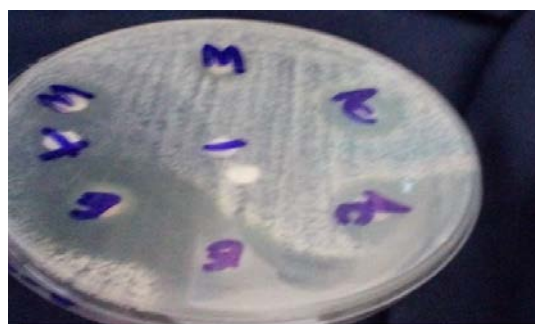
CA2c



CA3



CA3₂



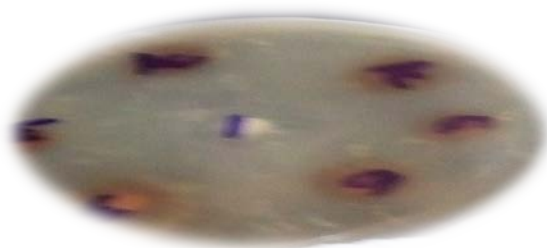
CA4

Figure n° 43 La sensibilité des souches de *candida albicans* vis-à-vis des extraits méthanolique éthanolique et acétonique (20mg/ml)

Tab 05. Activité antibactérienne des extraits d'écorces de grenades exprimée en diamètre d'inhibition (40mg/ml)

Extrait / Souches	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ECA1	<i>Enterococcus faecalis</i> ECB1	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ethanol	30,5	10,35	12	11	15,50	13,5
Méthanol	20	20,6	11,75	20	15,25	13
Acétone	20,4	20,05	10,11	21	15,05	12,5

Les diamètres d'inhibitions sont exprimés en mm.



S.aureus(SYc4)



Streptococcus constellatus(S5₂C₂)



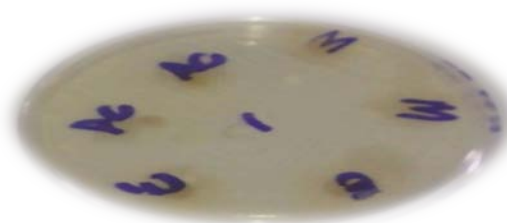
Streptococcus salivarius(SCR4)



Streptococcus mutans (SCMR₁)



Enterococcus faecalis(ECA1)



Enterococcus faecalis(ECB1)

Figure n°44 La sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis des extraits méthanolique éthanolique et acétonique (40mg/ml)

Tab 06. Activité antibactérienne des extraits d'écorce de grenade exprimée en diamètre d'inhibition (20mg/ml)

Souche / Extrait	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus Constellatus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ECA1	<i>Enterococcus faecalis</i> ECB1	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ethanol	20,5	20,05	20,2	11	22,5	12,5
Méthanol	30	10	20	20	19	14,5
Acétone	30,3	30,2	20,05	20,5	14	15

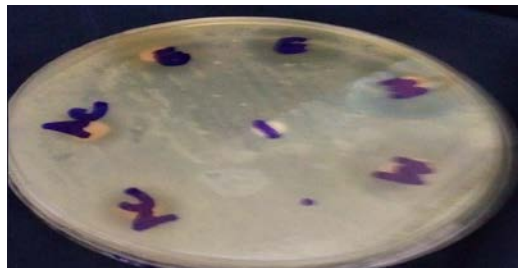
Les diamètres d'inhibitions sont exprimés en mm.



S. aureus(SYc4)



Streptococcus constellatus(S5₂C₂)



Enterococcus faecalis(ECA1)



Enterococcus faecalis (ECB1)



Streptococcus mutans(SCMR₁)



Streptococcus salivarius(SCR4)

Figure n° 45 La sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis aux extraits méthanolique, éthanolique et acétonique (20mg/ml)

4-3-Sensibilité aux antibiotiques et antifongiques (antibiogramme, antifongigramme)

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques, les tableaux ci-dessous rapportent les valeurs en mm des zones d'inhibitions manifestées par les antibiotiques et les antifongiques sur les différentes souches étudiées.

Les souches de *Candida albicans* ont montré des sensibilités aux antifongiques testé avec des diamètres d'inhibitions qui varient entre 15mm et 28mm pour le clotrimazole 12mm et 34 mm pour l'Econazole, ces souches ont montré une résistance vis-à-vis au fluconazole.

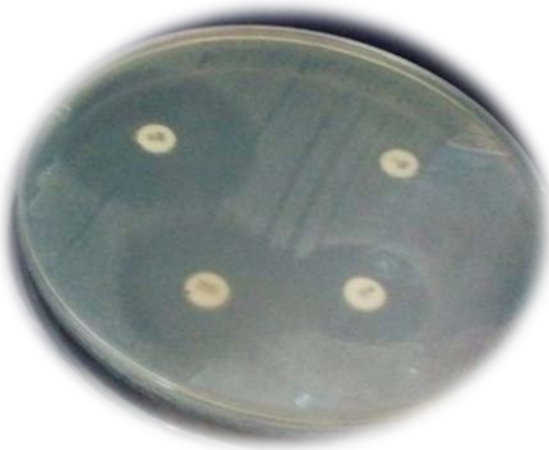
Les streptocoques et les entérocoques sont sensibles aux antibiotiques standard testé avec des diamètres de zones d'inhibition de 23mm, 50mm, 30mm, 30 mm, 34mm, 32mm, et 20 mm vis-à-vis aux CN, Amp, E15, TE, VA, LEV, N, respectivement pour *Streptococcus mutans*, suivi par l'*Enterococcus faecalis* ECB1 avec des diamètres d'inhibitions de 23mm, 34mm, 41mm, 37mm, 4mm, 35mm, 20mm vis-à-vis aux CN, Amp, E 15, TE, DA, LEV, N respectivement, alors qu'elle est résistante à la VA, puis *Enterococcus faecalis* ECA1 avec des diamètre d'inhibition de 16,5 mm, 32mm, 20 mm, 28mm, 21mm respectivement et elle est résistante à LEV, ensuite *Staphylococcus aureus* est relativement sensible à certains antibiotiques tels que CN 10 µg, CZ 30 µg, P 10 µg, C 30 µg avec des diamètres des zones d'inhibition de 18 mm, 29 mm et 20 mm, 22 mm respectivement.

Tab 07. AntibioGramme des germes étudiés en présence des antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

Souche / Antibiotique	E	DA	AMP	TE	LEV	CN	P	C	VA	N	CZ
<i>Streptococcus mutans</i>	30	34	50	32	32	23	/	/	30	20	/
<i>Streptococcus salivarius</i>	R	R	28	10	R	R	/	/	/	/	/
<i>Enterococcus faecalis</i> ECB1	41	4	34	37	35	23	/	/	R	20	/
<i>Enterococcus faecalis</i> ECA1	20	R	32	28	25	17	/	/	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	/	/	/	/	18	20	22	/	/	29

Les diamètres d'inhibitions sont exprimés en mm.

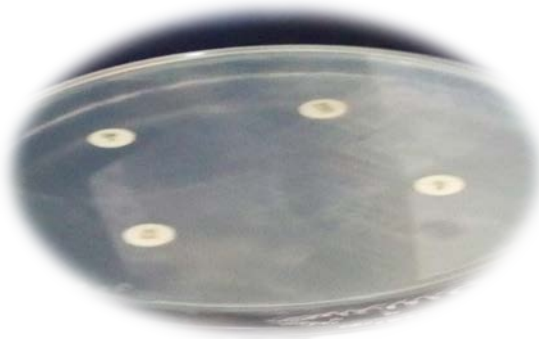
R résistante



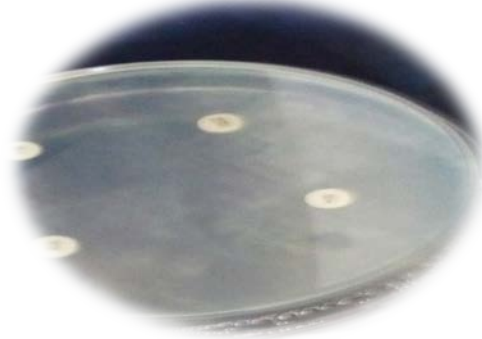
Sensibilité de *E. faecalis* ECA1 vis-à-vis de AMP, E, DA, TE



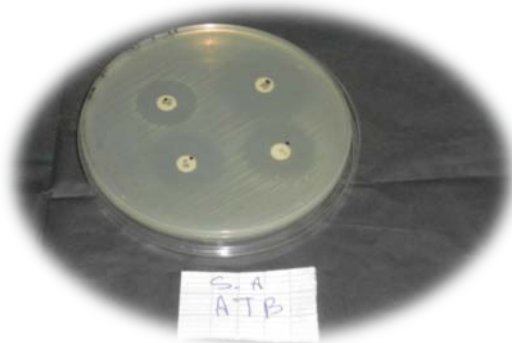
Sensibilité de *E. faecalis* ECA1 vis-à-vis de LEV, CN



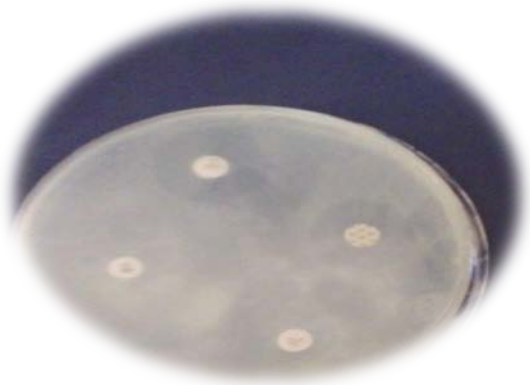
Sensibilité de *Enterococcus faecalis* ECB1 vis-à-vis de E, DA, AM, TE



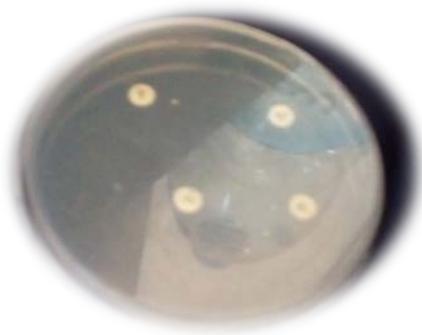
Sensibilité de *Enterococcus faecalis* ECB1 vis-à-vis de CN, N, LEV, VA



Staphylococcus aureus SYc4 vis-à-vis de CN, P, C, CZ



Streptococcus mutans vis-à-vis de N, E, DA, TE



Sensibilité de *Streptococcus salivarius* vis-à-vis de DA, N, CN, TE



Sensibilité de *Streptococcus mutans* vis-à-vis de AM, LEV, CN

Figure n°46 La sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis aux antibiotiques standard

Tab.8 Antifongogramme des germes étudiés en présence de fluconazole, Econazole et clotrimazole (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

Souches / Antifongique	Fluconazole	Econazole	Clotrimazole
<i>Candida albicans</i> CA1	R	15	1,2
<i>Candida albicans</i> CA2c	R	22,5	R
<i>Candida albicans</i> CA3	R	28	R
<i>Candida albicans</i> CA3 ₂	20	R	34
<i>Candida albicans</i> CA4	R	R	R

R: résistante.

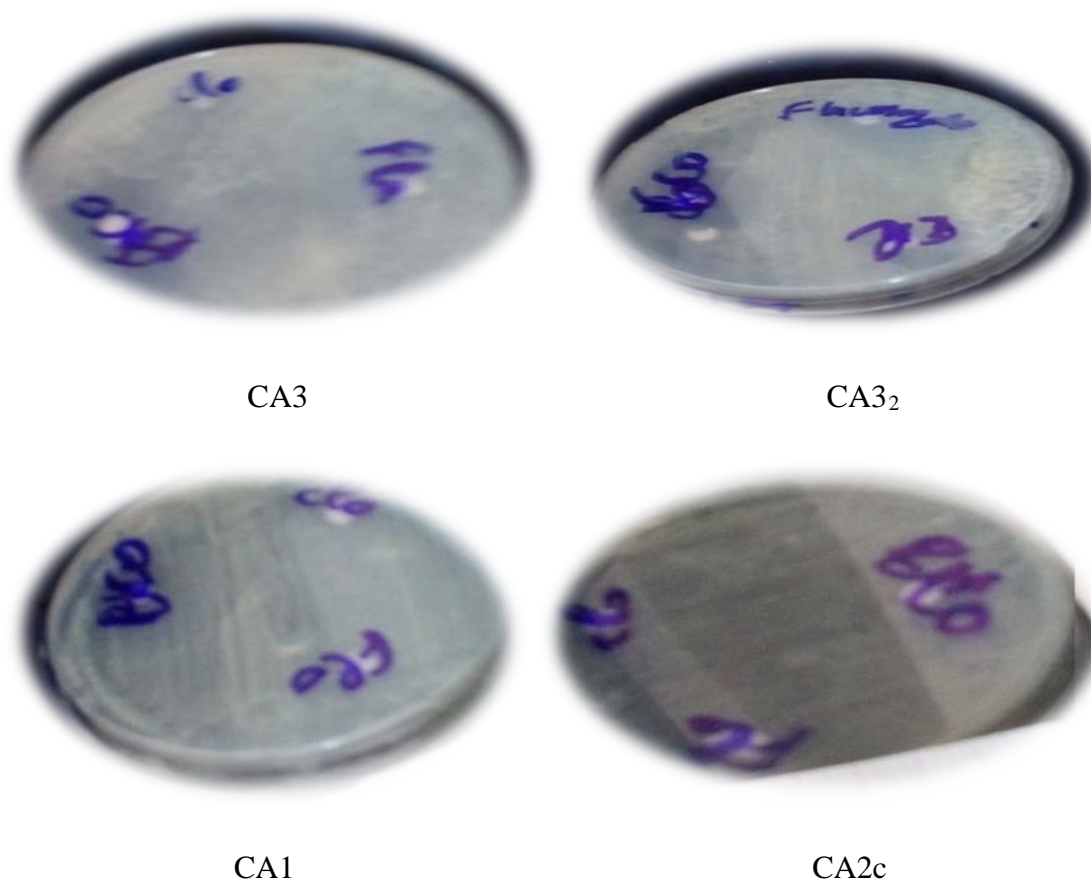


Figure n° 47 La sensibilité des souches de *candida albicans* vis-à-vis aux antifongique

Conclusion

Conclusion

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

Dans le présent travail, différents aspects d'écorces de la grenade ont été étudiés: quelques propriétés phytochimiques, activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits bruts. L'extraction d'écorces de grenades a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés : de 15,113% pour l'éthanol, de 33.913 % pour le méthanol et de 56.9 % pour l'acétone.

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 200, 180 et 80 mg (équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait) dans les trois extraits éthanol, acétone et méthanol respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$, leurs teneurs est de 80, 70 et 60 mg EQ/g Q (équivalent de quercitine par gramme d'extrait) dans les trois extraits respectivement. Les tanins sont estimés en utilisant la méthode colorimétrique en présence d'acide sulfurique, leurs teneurs est de 122, 137 et 222 mg EQ/g C (équivalent de la catéchine par gramme d'extrait) dans les trois extraits respectivement.

L'activité antioxydante des différents extraits d'écorces de la grenade a été évaluée par la méthode de réduction du radical libre DPPH. Les résultats ont montré que l'activité antioxydante est élevée dans l'extrait éthanolique, par contre elle est faible pour les deux autres extraits.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur 11 souches microbiennes, selon la méthode de diffusion de disques, Les résultats indiquent que les trois extraits possèdent une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées.

Conclusion

La zone d'inhibition la plus importante a été observée avec l'extrait méthanolique à une concentration de 40g/ml vis-à-vis de la souche de *Candida albicans* CA2_c, la rendant ainsi la souche la plus sensible aux extraits méthanoliques d'écorce de la grenade.

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

Références bibliographique

A

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

Amouretti M.C., Comet .G. - Cahier d'histoire des techniques - Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'université de Provence. 1992. 174 pages. Page 81 .

Aas, J. a, Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–32.

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

Ajdic', D., et Pham, V.T. 2007. Global transcriptional analysis of *Streptococcus mutans* sugar transporters using microarrays. *J.Bacteriol.* 189(14) : 5049–5059.

B

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

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

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

Buffo, J., Herman, M. A. and Soll, D. R., A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1984. **85**: 21-30.3.

Boizot N., and Charpentier .J.P.(2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

C

Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. 2005. The global burden of group

A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*, vol 5, N°11, P : 685-94 .

Chu, W. S., Magee, B. B. and Magee, P. T., Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol* 1993. **175**: 6637-6651.

Calderone RA & Fonzi WA. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* **9**, 327-335.

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

Cazin F.J. - Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées. Editions de l'envol. 1868. 1189 pages. Pages 497-501.

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

Crozes, Didier. Izilox, Ketek, Zyvoxid : place des « nouveaux » antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique existant. 2005. Thèse de doctorat : Pharmacie, Université de Toulouse, n° TOU3 2052. p111.

Chenoweth, C., and D. Schaberg.1990. The epidemiology of enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* V9:80-89.

Corredoira, J. C., Alonso, M. P., García, J. F., Casariego, E., Coira, A., Rodriguez, A., Varela, J. (2005). Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 24(4), 250–5.

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

D

Dean, F.M., 1963. Natural occurring Oxygen Ring Compounds. Butterworths. Londres. P 148.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schkeufer, K.H., Stackebrandt, E. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd. ;Springer, New-York, 2006. Vol 4, Chap.1.2.1. The genera Staphylococcus and Micrococcus, p4-75.

Dougherty, and C. M. Fraser.2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis. Science 299:2071-2074.

F

Fatope, M.O., Al Burtomani, S.K., Takeda, Y., 2002. Monoacylglycerol from Punica granatum seed oil. J. Agric. Food Chem. 50, 357–360.

Fleuriet, A., Jay-Allemand. C., Macheix. J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes pp 121- 216.

Flahaut, S., P. Boutibonnes, and Y. Auffray.1997. Enterococci in human environment. Can. J. Microbiol. 43:699-708.

G

Gabor, M., Cody, V., Middleton, E.J., Harborne, J.B., Beretz, A., Liss, A.R., 1988. Plants Flavonoids in biology and Medicine II; Biochemical. Cellular and Medicinal properties. New York. 1-15 p.

Garmier F., Denis .f.2011. Cocci à Gram positif. Bactériologie médicale, N°32, P: 287-330.

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

Ghadirian, P., Ekoe, J.M., Thouez, J.P., 1992. Food habits and esophageal cancer: an overview. Cancer Detect. Prev. 16, 163–168.

Granier F : Antibiotiques : classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. Antibiotiques, 2003, 5: 39-48

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

Guignard, J.L., Potier, P., 2000. Biochimie Végétale. Dunod. Paris.

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



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

Hakalehto, E., Vilpponen-Salmela, T., Kinnunen, K., & von Wright, A. (2011). Lactic Acid bacteria enriched from human gastric biopsies. *ISRN Gastroenterology*, 2011, 109183.

Han, X. Y., Kamana, M., & Rolston, K. V. I. (2006). Viridans streptococci isolated by culture from blood of cancer patients: clinical and microbiologic analysis of 50 cases. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 160–5.

Hegde, V.L., Mahesh, P.A., Venkatesh, Y.P., 2002. Anaphylaxis caused by mannitol in pomegranate (*Punica granatum*). *Allergy Clin. Immunol. Int.* 14, 37–39.

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

Hincky-Vitrat V. : Les antifongiques systémiques. Clinique maladies infectieuses-CHU Grenoble, 2011.

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

J

Jurenka JS,(2008); Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L*); a review. *Altern Med Rev.* Jun;13(2):128-44.

Jérôme Gros jean.2009. Bactériologie et virologie pratique. Edition de Boech université, P:81-84.

Jacobs JA, Schouls LM, Whiley RA (January 2000). "DNA-DNA reassociation studies of *Streptococcus constellatus* with unusual 16S rRNA sequences". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50. Pt 1: 247–9.

9

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M & Kozik A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochimica Polonica* 56, 211-224.

Kaplan EL, Rodriguez B, Schreiber JR, Salata RA, Palavecino E, et al. A.2003. Family Cluster of Five Cases of Group A Streptococcal Pneumonia. *Pediatrics*, vol 112 , N°1, P: 61-65.

Kloos, WE., Zimmerman, RJ., Smith, RF. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl Environ Microbiol.* 1976; 31, p53-49.

Kitten, T., Munro, C. L., Zollar, N. Q., Lee, S. P., & Patel, R. D. (2012). Oral streptococcal bacteremia in hospitalized patients: taxonomic identification and clinical characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 1039–42.

L

Laughton, M. J., Halliwell B., Evans, P. J., Robin, J. & Hault, S. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology* 38(17), 2859-2865.

Lemoine .E. - Guide des fruits du monde - Les fruits de nos régions, les variétés exotiques. Collection les compagnons du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé. 1998. 192 pages. Page 151.

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

M

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

Mavor, A. L., Thewes, S. and Hube, B., Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* 2005. **6**: 863-874.

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

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

N

Naveena B.M., Sen, A.R. Vaithyanathan S., Babji Y., Kondaiah N., 2008. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science* 80, 1304–1308

Negi P. and Jayaprakasha, J., 2003. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science*, Vol. 68, No. 4, pp. 1473-1477.

O

Odds, F.C. 1988. *Candida* and candidosis. Baillière Tindall, London, United Kingdom.

P

Paulsen, I. T., L. Banerjei, G. S. Myers, K. E. back, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Planchon G., Collin E. - Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale. Librairie F. Savy. 1875. Tome I. Pages 235-236 et 307-308.

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

Price, M.L., S. Van Scoyoc, and L.G. Butler. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agr. Food Chem.* 26:1214-1218.

R

Ribereau-Gayon, J., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Traité d'œnologie. Edition Dunod. Paris. 254 p.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66, 401- 436

Richards, V. P., Palmer, S. R., Pavinski Bitar, P. D., Qin, X., Weinstock, G. M., Highlander, S. K., Stanhope, M. J. (2014). Phylogenomics and the Dynamic Genome Evolution of the Genus *Streptococcus*. *Genome Biology and Evolution*, 6(4), 741–753.

Q

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.

S

Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1990. Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton. Florida: CRC press. Pp 113-146.

Singleton, V.L., Joseph, A., Rossi, J.R., 1965. Colorometry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-153

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 152-178.

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

Squillaci, G., Di Maggio, G., 1946. Acute morbidity and mortality from decoctions of the bark of *Punica granatum*. *Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale* 1946, 1095–1096

Shirokawa, T., Nakajima, J., Hirose, K., Suzuki, H., Nagaoka, S., & Suzuki, and M. (2014). Spontaneous Meningitis Due to *Streptococcus salivarius Subsp. salivarius* : Cross-reaction in an Assay with a Rapid Diagnostic Kit that Detected *Streptococcus pneumoniae* Antigens.

T

Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Eisen, J. a, Peterson, S., Wessels, M. R., Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19),

V

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. *J. Ethnopharm.* 89, 295–300.

W

Wilson, M., Martin, R., Walk, S. T., Young, C., Grossman, S., McKean, E. L., & Aronoff, D. M. (2012). Clinical and laboratory features of *Streptococcus salivarius* meningitis: a case report and literature review. *Clinical Medicine & Research*, 10(1), 15–25.

Whiley, R.A., Beighton, D., Winstanley, T.G., Fraser, H.Y. and Hardie, J.M. (1992) *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group).

Z

Zahin M., Aqil F., Ahmad I., 2010. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research* 703 (2010) 99–107.

Les Annexes

Les Annexes

Muller Hinton solide

Peptone de caséine	17,5g
Extrait de viande	2g
Amidon	1,5g
Agar	18g
Eau distillé	1l
PH.....	7,3

Muller Hinton liquide

Treptone	17,5g
Extrait de viande	2g
Amidon	1,5g
Eau distillé	1000ml
PH	7,3

Gélose nutritive

Peptone	6g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Nacl.....	5g
Eau distillé.....	1000ml
Agar.....	12g
PH.....	7,2

Gélose nutritive liquide

Peptone.....	6g
Extrait de viande	1g
NACL.....	5g

Les Annexes

Eau distillé	1000ml
Extrait de levure	2g
PH.....	7,2

Sabouraud solide

Peptone.....	10g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillé	1000ml
PH	6

Sabouraud liquide

Peptone	10g
Glucose	20g
Eau distillé	1000ml
PH.....	6

M17 Solide

M17 agar	53,7g
L'eau distillée	1000ml

Solution de Carbonate de sodium

Carbonate de sodium	37,5 g
Eau distillé	500ml

Solution de triChlorure d'aluminium

Chlorure d'aluminium.....	4g
Ethanol.....	100ml

Les Annexes

Solution de Folin ciocalteu

Réactif de Folin ciocalteu	10ml
Eau distillé	100ml

Solution de la catéchine

Catéchine.....	4mg
Eau distillé.....	10ml

Solution de vanilline

Vanilline.....	1g
Méthanol	1ml

Solution d'acide sulfurique

Acide sulfurique	100ml
Méthanol	300ml

Solution de quercitine

Quercitine.....	4g
Eau distillé.....	10ml

Solution de DPPH

DPPH	0 ,0025g
Méthanol.....	100ml

Solution d'acide ascorbique

Acide ascorbique	10mg
Méthanol	10ml

Les Annexes

Solution d'acide gallique

Acide gallique.....	0,110
Eau distillé.....	100ml

L'eau physiologique

Na cl	0,9g
L'eau distillée	100ml

Fluconazole

Fluconazole	50mg
L'eau distillée stérile	10ml