

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITE ABDELHAMID BEN BADIS DE MOSTAGANEM
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
Laboratoire de pharmacognosie api phytothérapie



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en
Biologie. Option : phytothérapie et santé

Thème

L'EFFET DE *Punica granatum* SUR LA FLORE GASTRIQUE ; ETUDE *IN VITRO* ET *IN VIVO* CHEZ LE RAT

Présenté par : M. REGUIEG YSSAAD Athmen

Soutenu publiquement le 21/02/2019
Devant les membres de jury :

M ^{me} DALACHE Fatiha	Pr	Présidente	Université de Mostaganem
M ^{me} HAMMADI Kheira	Pr	Promotrice	Université de Mostaganem
M.BEKADA Ahmed M A	Pr	Examineur	C Universitaire de Tissemsilt
M. KHAROUBI Omar F	Pr	Examineur	Université d'Oran 1
M.BOUDEROUA Kaddour	Pr	Examineur	Ecole S A de Mostaganem
M ^{me} MISSOUN Fatiha	MCA	Examinatrice	Université de Mostaganem

Remerciements

Une thèse est rarement le fruit d'un parcours en solo, mais bel et bien le résultat d'une multitude de rencontres, de volontés encouragées et encourageantes, d'efforts communs, de réflexions, de soutiens, d'interrogations, de réponses partagées. Ce travail n'a pas échappé à cette règle. A ce titre je voudrais remercier l'ensemble des personnes qui de près ou de loin ont permis l'avancée et l'aboutissement de ce travail mais également mon épanouissement personnel.

Mes plus sincères remerciements s'adressent tout d'abord à la directrice de cette thèse Mme.HAMMADI K. pour la confiance qu'elle m'a accordé, pour son soutien, ses critiques constructives qui m'ont permis d'évoluer dans ma vision de la recherche scientifique. Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse. Je vous adresse ma profonde reconnaissance pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.

Je remercie également M^{me} DALACHE Professeur à l'université de Mostaganem pour avoir accepté de présider le jury d'examinations de cette thèse, qu'elle trouve ici mes profondes reconnaissances. Je tenais à remercier également sincèrement Mr BEKKADA .A , Mr KHAROUBI .O.,F,Mr. BOUDEROUA .K, M^{me} MISSOUN .F pour avoir accepté d'examiner ce travail.

A vrai dire, je ne sais pas comment vous remercier chère collègue RIGHI S. enseignante à l'université de Mascara . Merci pour l'énorme effort que m'avez apportée afin de réaliser ce travail.

J'exprime également mes profondes reconnaissances à tous les techniciens des laboratoires pédagogiques de SNV de l'université de Mascara, qui m'ont aidé durant ce travail.

Ce travail n'aurait pu être mené sans l'aide précieuse de BELKHODJA Hamza, BELMIMOUN Asma et SIDELARBI Khadidja , doctorants en biologie à l'université de Mascara. Qu'ils trouvent ici mes remerciements les plus profonds.

Une pensée particulière pour mon ami BENHMED W, tu es toujours à mes côtés et tu m'avais toujours apporté le soutien. Pour cela, je te remercie chaleureusement.

Je souhaite enfin finir par une pensée envers mes proches, bien sûr pour leur soutien tout le long de mes études, toute la famille. Je n'oublie pas non plus mes chers amis de l'université Mostaganem, Mascara et Sidi-Bel-Abbès qui m'ont accompagné durant toutes mes études.

Liste des abréviations

Ac	Acide
ADH	Arginine Dihydrolase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AGCC	Acides gras à Chaînes courtes
AGPI	Acides Gras Polyinsaturés
<i>al</i>	Collaborateurs
C	Clostridium
CH ₄	Méthane
cl	Centilitre
cm	Centimètre
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
CO ₂	Dioxyde de carbone
D	Diamètre
DMSO	Dimethyl sulfoxyde
DNAse	Désoxyribonucléase
DO	Densité Optique
<i>E.</i>	Escherichia
EMPG	Extrait methanolique de <i>punica granatum</i>
EPS	Exopolysaccharides
g	Gramme
GALT	Tissu lymphoïde associé du tractus gastro-intestinal
GEA	Gastroentérite aiguë
GN	Gélose Nutritive
h	Heure
H ₂	Dihydrogène
H ₂ O ₂	Eau oxygénée/peroxyde d'hydrogène
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
Ig	Immunoglobuline
IL-10	Interleukine 10
Kg	Kilogramme
l	Litre
<i>L.</i>	Lactobacillus
LDL	Low Density Lipoprotein

Log	Logarithme
LPS	Lipopolysaccharide
m ²	Mètre carré
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
MRS	Man Rogosa Sharpe
Na Cl	Chlorure de sodium
NCCLS	« National Committee on Clinical Laboratory Standards », organisme américain chargé de définir les normes de biologie clinique.
NFκB	Receptor activator of nuclear factor kappa B
NH ₃	Ammoniac
NK	Natural killer
NO	Monoxyde d'azote
∅	Diamètre
OMS	Organisation Mondiale de Santé
PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns
pg	Picogramme
pH	Potentiel d'hydrogène
PRR	Pathogen recognition receptors
<i>S.</i>	Staphylococcus
SFM-CA	Société Française de Microbiologie-Comité de l'Antibiogramme
<i>sp.</i>	Espèce non précisée
<i>spp.</i>	Plusieurs espèces non précisées
TB	Translocation Bactérienne
TGF β	Transforming Growth Factor β
Th	Lymphocytes T helper
TLRs	Toll-like receptors
TNFα	Tumor necrosis factor-alpha
UFC	Unité formant colonies
UV	Ultraviolet
V	Volume
α	Alpha
β	Béta
-	Négatif
%	Pourcentage
+	Positif
°C	Degré Celsius
μl	Microlitre
μm	Micromètre



Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Partie bibliographique

Chapitre I : *Punica granatum*

1.Introduction	03
2.Origine géographique et aire de répartition du grenadier	03
2.1 Origine géographique.....	03
2.2 Aire de répartition géographique	04
2.3 Production de la grenade	04
3.Classification de <i>Punica granatum</i>	05
4.Autres dénominations	05
4.1.Synonymes	05
4.2.Les dénominations communes dans différentes langues	06
5.Description botanique de grenadier	06
6.Valeur nutritionnelle	08
7.Propriétés thérapeutiques	08
8.Toxicité du grenadier.....	09

Chapitre II : Substances antimicrobiennes d'origine végétale

1. Généralités.....	10
2. Définition des polyphénols	10
3. Rôle des polyphénols	10
4. classification des composés phénoliques.....	11
4.1 Les acides phénoliques et les coumarines	12
4.1.1 Les acides phénoliques	12
4.1.2. Les coumarines	13
4.2. Les flavonoïdes.....	15
4.3. Les tanins.....	16
4.3.1. Les tanins hydrolysables.....	16
4.3.2. Les tanins condensés.....	17
5. Intérêts des composés phénoliques.....	17
6. Polyphénols de grenade.....	18
6.1. Activité neuroprotectrices	19
6.2. Activité protectrice de l'estomac et du foie.....	20
6.3. Activité anti-inflammatoire	20
6.4. Activité préventive des maladies cardiovasculaires.....	20
6.5. Activité préventive d'arthrite	21
6.6. Activité antidiabétique.....	21
6.6. Activité anticancéreuse.....	22



6.7. Activité cicatrisante	23
6.8. Activité antivirale	23
7. Toxicité des polyphénols de grenade.....	23
8. Biodisponibilité des polyphénols de grenade.....	24

Chapitre III: La flore gastrique

1. Microbiote intestinal	25
2. Classification de la flore intestinale	25
3. Répartition topographique de la flore intestinale	26
3.1. Estomac	28
3.2. Intestin grêle.....	28
3.3. Côlon	28
4. Facteurs contrôlant la microflore intestinale.....	28
4.1. Le pH	29
4.2. L'oxygène.....	29
4.3. L'âge	29
4.4. L'alimentation	30
4.5. La motricité intestinale	30
4.6. Interactions hôtes – Microbes.....	30
4.7. Interactions Microbe-Microbe.....	30
a) Interactions négatives.....	30
b) Interactions positives.....	31
5. Mise en place du microbiote intestinale	31
5.1. Phase 1	31
5.2. Phase 2	32
5.3. Phase 3	32
5.4. Phase 4.....	32
6. Facteurs influençant l'installation du microbiote intestinale chez le nouveau-né.....	33
6.1. Le type d'alimentation du nouveau-né	33
6.2. Influence du mode d'accouchement.....	33
6.3. L'influence de l'environnement	34
6.4. Influence du terme de naissance	34
6.5. Influence de l'antibiothérapie.....	35
7. Intérêt et rôle du microbiote intestinal	35
7.1. Effet barrière de la flore intestinale	35
7.2. Effet métabolique	36
7.3. Rôle de la flore intestinale dans la mise en place du système immunitaire intestinal.....	37
7.4. Flore intestinale et insulino-résistance.....	39
7.5. Prévention du cancer colique.....	40
7.6. Réduction du cholestérol	40
7.7. Autres bénéfices sanitaires	41
8. Facteurs d'agression de la flore intestinale	41
8.1. L'antibiothérapie	41
8.2. L'utilisation des traitements antiacide.....	41



8.3. Carence en fibres alimentaires	42
8.4. Gastroentérite aiguë.....	42

Partie expérimentale I. Matériel et Méthodes

I1. Matériel végétal.....	43
I2. Extraction des polyphénols	44
I2.1. Préparation des extraits phenoliques	44
I.2.3. Rendement des extraits	45
I3. Screening phytochimique	46
I4. Dosage phytochimique	47
I.4.1. Dosage des poly phénols totaux.....	47
I4.2. Dosage des flavonoïdes	48
I4.3. Dosage des flavones et flavonols	48
I4.4. Dosage des tannins condensés.....	49
I5. Identification et quantification des composés phénoliques de l'extrait methanolique par HPLC.....	49
I6. Etude in vitro de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques.....	50
I6. 1.Souches bactérienne utilisées.....	50
I6.2. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques	50
I6.3. Activité antibactérienne par technique de diffusion en milieu solide	51
I6.3.1. Préparation des concentrations.....	51
I6.3.2. Préparation de l'inoculum bactérien	51
I6.3.3. Ensemencement.....	51
I6.3.4. Incubation.....	52
I6.3.5. Expression des résultats.....	52
I6.4. Etude la cinétique de croissance et la CMI par la microplaque.....	52
I6.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	53
I6.6. Le rapport CMB/CMI.....	54
I7. Etude <i>in vivo</i>	54
I7.1. Les animaux	54
I7.1.1. Accouplement	54
I7.1.2. Elevage.....	55
I7.2. Evaluation de la toxicité de l'extrait methanolique de l'épicarpe de <i>Punica granatum</i> ..57	
I.7.2.1. Préparation des extraits	57
I7.3. Evaluation de l'activité antibactérienne vis à vis <i>B. cereus</i>	59
I7.3.1. Préparation de l'inoculum de <i>Bacillus cereus</i>	59
I.7.3.2. Choix de la dose.....	59
I.7.3.3. Répartition des lots	59
I7.3.5. Détection de <i>Bacillus cereus</i>	61
I7.3.6. Sacrifices	61
I7.3.7. Le poids relatif des organes internes	61
I7.3.8. Prélèvement de l'appareil digestif.....	62



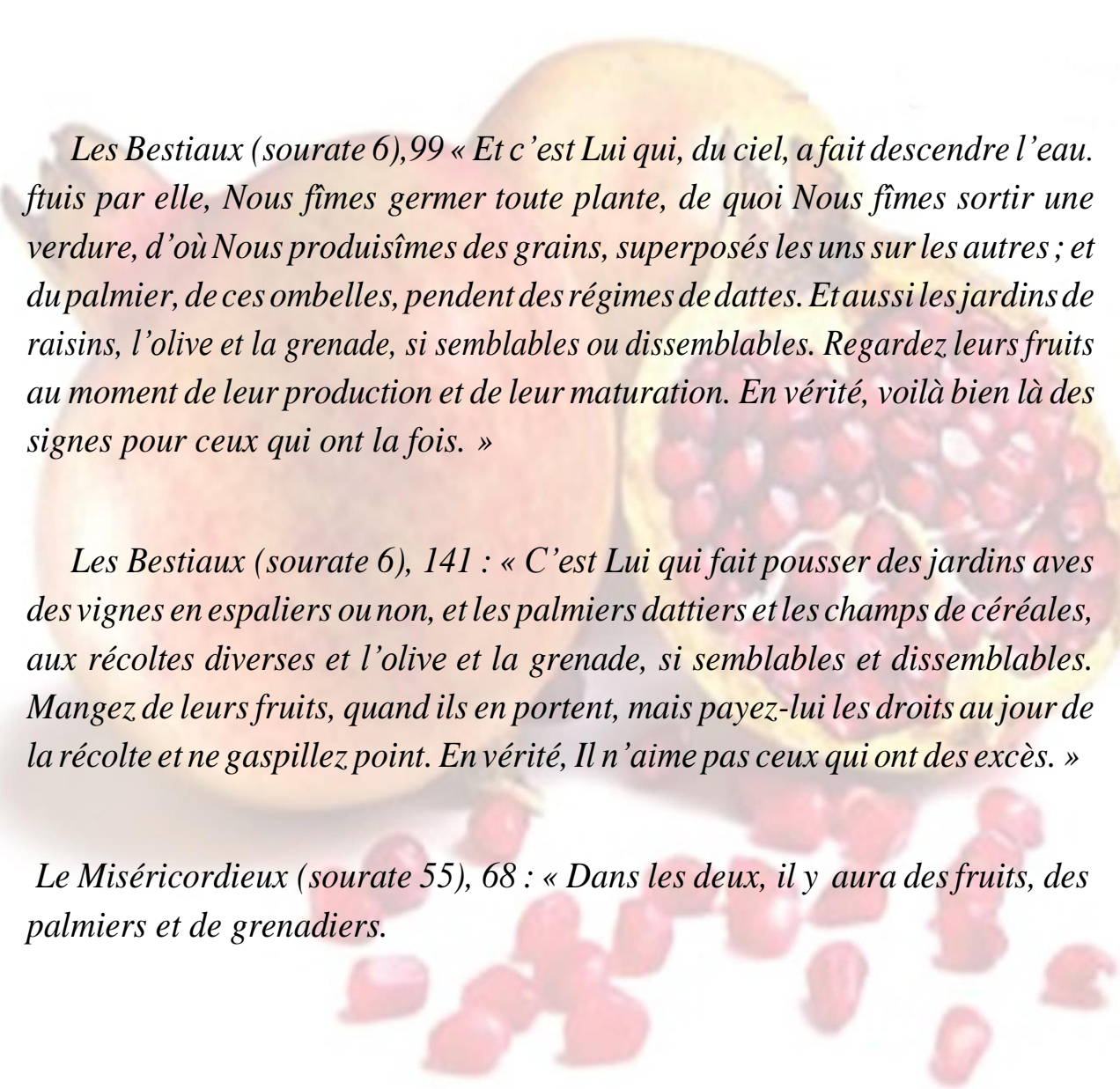
I.7.4. Analyse microbiologique	63
I.7.4.1. Traitement des échantillons.....	63
I.7.4.2. Recherche et dénombrement des germes dans le sang et dans les organes de translocation	64
I.7.5. Etude histologique.....	66
I.7.5.1. Fixation des pièces	66
I.7.5.2. Déshydratation	66
I.7.5.3. Inclusion.....	66
I.7.5.4. Coupe des pièces	67
I.7.5.5. Coloration.....	67
I.7.6. Analyse statistique	68

II :Résultats et Discussion

II.1. Rendement d'extraction	69
II.2. Analyses phytochimiques	69
II.2.1. screening phytochimique	69
II.2.2. Dosage des polyphénols totaux ,flavonoides,flavones et tannins condensés	70
II.2.3. Identification et quantification des composés phénoliques de l'extrait methanolique des par HPLC.....	74
II.4. Sensibilité des souches vis-à-vis les différentes antibiotiques	76
II.5. Activité antimicrobienne des extraits phénoliques	77
II.6. Etude <i>in vivo</i>	95
II.6.1. Etude de la toxicité aigue	95
II.6.1.1. Suivi de mortalité des rats	95
II.6.1.2. Suivi du comportement des rats.....	96
II.6.1.3. Suivi du Poids corporel	97
II.6.2. Résultats de l'activité anti- infectieuse <i>in vivo</i>	98
II.6.2.1. Evolution des signes cliniques	98
II.6.2.2. Evolution pondérale	99
II.6.2.3. Evolution pondérale chez les rats.....	100
II.6.3. Détection de <i>B. cereus</i>	101
II.6.4. Poids relatif des organes.....	102
II.6.5. Evaluation de la translocation bactérienne.....	104
II.6.5.1. Détection de <i>B. cereus</i> dans les différents organes de translocation.....	104
II.6.5.2. Etude de la translocation bactérienne de flore résidante et transitoire du tube digestif.....	107
II.6.6. Résultats des analyses histologiques.....	112
Conclusion	118

Références bibliographiques

Annexes



Les Bestiaux (sourate 6), 99 « Et c'est Lui qui, du ciel, a fait descendre l'eau. ftuis par elle, Nous fîmes germer toute plante, de quoi Nous fîmes sortir une verdure, d'où Nous produisîmes des grains, superposés les uns sur les autres ; et du palmier, de ces ombelles, pendent des régimes de dattes. Et aussi les jardins de raisins, l'olive et la grenade, si semblables ou dissemblables. Regardez leurs fruits au moment de leur production et de leur maturation. En vérité, voilà bien là des signes pour ceux qui ont la fois. »

Les Bestiaux (sourate 6), 141 : « C'est Lui qui fait pousser des jardins avec des vignes en espaliers ou non, et les palmiers dattiers et les champs de céréales, aux récoltes diverses et l'olive et la grenade, si semblables et dissemblables. Mangez de leurs fruits, quand ils en portent, mais payez-lui les droits au jour de la récolte et ne gaspillez point. En vérité, Il n'aime pas ceux qui ont des excès. »

Le Miséricordieux (sourate 55), 68 : « Dans les deux, il y aura des fruits, des palmiers et de grenadiers.

Résumé

L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique ancienne. La grenade (*Punica granatum*) a fasciné toutes les civilisations par sa beauté et sa jutosité du fruit. Utilisé de manière empirique dans les médecines traditionnelles, pour traiter les maladies gastro-intestinales et les maladies parasitaires, ainsi que des propriétés antimicrobiennes. Cette recherche porte sur l'étude phytochimique et le dosage des composé polyphénolique de différents extraits phénoliques de l'écorce de la grenade (*Punica granatum*) d'une part, et l'évaluation de leur activité antibactérienne in vitro ainsi que l'étude in vivo de la toxicité aiguë de l'extrait méthanolique et l'évaluation de sa propriété antibactérienne sur la flore intestinale d'une autre part.

Toutefois, *Punica granatum* révèle une immense richesse en composées phénoliques particulièrement les polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et tannins condensés dans les extraits de *Punica granatum* avec des valeurs allant jusqu'à 336.14 ug EAG/mg pour les polyphenols totaux, 27 ug EC/mg pour les flavonoïdes tandis, 39.01 ug EQ/mg pour les falavones, tandis que les tannins condensé sont de 153 ug EC/mg. Selon les résultats de l'antibioaromatogramme, l'ensemble de nos extraits phénoliques ont prouvé un effet antimicrobien sur toutes les souches testées avec une fort pouvoir inhibiteur comme les antibiotiques ou des fois plus.

Dans la présente étude la DL50 de l'extrait méthanolique calculée est incluse entre 500mg/kg et 8000mg/kg (6000 mg/kg). On en conclut que l'extrait méthanolique de *punica granatum* est considéré comme étant faiblement toxique. Une absence du germe pathogène est mentionnée dans la majorité des organes des rats infectés traités, ce qui prouve son élimination par l'extraits phénolique de *punica granatum*, sauf pour les l'intestin Ce qui prouve son activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* qui peut contribuer à la lutte contre les maladies infectieuses.

Sachant que *Punica granatum* se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches ultérieures.

Mots-clés: *Punica granatum* ; extrait phénolique ; analyse phytochimique ; activité antimicrobienne ; étude *in vitro* et *in vivo*

Abstract

The use of medicinal plants for therapeutic purposes is an old practice. The pomegranate (*Punica granatum*) has fascinated all civilizations by its beauty and juiciness of the fruit. Used empirically in traditional medicines, to treat gastrointestinal diseases and parasitic diseases, as well as antimicrobial properties. This research focuses on the phytochemical study and the determination of the polyphenolic compound of various phenolic extracts of pomegranate bark (*Punica granatum*) on the one hand, and the evaluation of their antibacterial activity *in vitro* as well as the study *in vivo* the acute toxicity of the methanolic extract and the evaluation of its antibacterial property on the intestinal flora on the other hand.

However, *Punica granatum* reveals an immense richness in phenolic compounds especially total polyphenols, flavonoids, flavones and tannins condensed in extracts of *Punica granatum* with values up to 336.14 μg EAG / mg for total polyphenols, 27 μg EC / mg for flavonoids while, 39.01 μg EQ / mg for flavones, while condensed tannins are 153 μg EC / mg. According to the results of the antibiogram, all of our phenolic extracts proved an antimicrobial effect on all strains tested with a high inhibitory power such as antibiotics or more times.

In the present study the LD₅₀ of the calculated methanolic extract is included between 500mg / kg and 8000mg / kg (6000mg / kg). It is concluded that the methanolic extract of *Punica granatum* is considered to be of low toxicity. An absence of the pathogenic germ is mentioned in the majority of the organs of the infected rats, which proves its elimination by the phenolic extracts of *Punica granatum*, except for the intestine which proves its antibacterial activity against *Bacillus cereus* which can contribute to the fight against infectious diseases.

Knowing that *Punica granatum* is characterized by a rather large reservoir of secondary metabolites with particular therapeutic and pharmacological characteristics that require to be exploited by subsequent research.

Keywords: *Punica granatum*; phenolic extract; phytochemical analysis; antimicrobial activity; *in vitro* and *in vivo* study

ملخص

استخدام النباتات الطبية لأغراض علاجية هو ممارسة قديمة. وقد فتن الرمان جميع الحضارات بجماله وعصير فاكهته المميز والذي يستخدم تجريبيا في صناعة الأدوية التقليدية لعلاج أمراض الجهاز الهضمي والأمراض الطفيلية ، فضلا عن خصائصه المضادة للميكروبات.

يركز هذا البحث على دراسة البيوكيميائية لمختلف المقتطفات الفينولية المستخلصة من لحاء فاكهة الرمان من جهة، وتقييم نشاطها المضاد للبكتيريا في المختبر وكذلك الدراسة في الجسم الحي للسمية الحادة لمستخلص الميثانول وتقييم خصائصه المضادة للبكتيريا على الميكروبات المعوية من ناحية أخرى.

من خلال هذا البحث، الرمان يكشف ثروة هائلة من المركبات الفينولية خاصة الإجمالية البوليفينول، الفلافونويد، فلافون والعفص مكثف في مقتطفات من الرمان مع القيم يصل إلى 336.14 ميكروغرام معادلة لحمض القاليك في الميلغرام الواحد من المستخلص بالنسبة لمجموع البوليفينول، 27 ميكروغرام معادلة للكيرستين في الميلغرام الواحد من المستخلص بالنسبة للفلافونويد، 39.01 ميكروغرام معادلة للكيرستين في الميلغرام الواحد من المستخلص بالنسبة للفلافون ، في حين أن العفص مكثف 153 ميكروغرام معادلة للكاتشين في الميلغرام الواحد من المستخلص . ووفقا لنتائج النشاط المضاد للبكتيريا، أظهرت جميع مقتطفات الفينولية تأثير مضاد للميكروبات على جميع سلالات اختبار مع قوة مثبطة قوية مثل المضادات الحيوية أو أكثر في بعض المرات.

في هذه الدراسة ، تم إدراج الجرعة المميتة 50 من مستخلص الميثانول المحسوب بين 500 ملغ / كغ و 8000 ملغ / كغ (6000 ملغ / كغ). وخلصت الدراسة إلى أن مستخلص الميثانول من الرمان يعتبر منخفض السمية . يشار ايضا الى غياب الجراثومة المسببة للمرض في معظم أجهزة الفئران المصابة المعالجة، مما يثبت القضاء عليه من قبل مقتطف الفينول للرمان، باستثناء الأمعاء مما يؤكد نشاطه المضاد للجراثيم ضد البكتيريا العصوية والذي يمكن أن يساهم في مكافحة الأمراض المعدية.

مع العلم أن الرمان يتميز بمستودع كبير نسبيا من المستقبلات الثانوية ذات الخصائص العلاجية والدوائية الخاصة التي تحتاج إلى استغلال من خلال البحوث اللاحقة

كلمات البحث: الرمان ؛ مستخلص فينولي؛ التحليل البيوكيميائي ؛ نشاط مضاد للميكروبات في المختبر ؛ الدراسة في الجسم الحي

A photograph of pomegranates and seeds. On the left is a whole, ripe pomegranate with a reddish-brown skin. To its right is a pomegranate that has been cut open, revealing its bright red, juicy seeds. Several individual seeds are scattered on the white surface in front of the open fruit. The background is plain white.

Partie :01
Etude bibliographique

Introduction générale





Depuis plusieurs années, l'homme qui vit côte à côte avec les plantes, est habitué à les consommer pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire et l'industrie (Encyclopédie Larousse, 2001).

Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, notamment la disponibilité d'une gamme large de produits de santé, les traitements médicamenteux actuels restent insuffisants. (Hamimed, 2009).

Aussi, au vu de la propagation du phénomène de résistance et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles cibles d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives (Yagupsky, 2006).

Le règne végétal constitue une source inépuisable de nouvelles molécules utilisables directement comme principe actif ou pouvant servir comme molécule guide pour le développement de nouveaux agents antioxydants. La recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle constitue un axe important de recherche au niveau mondial.

La grenade est un arbuste indigène de l'Asie occidentale et l'Europe méditerranéenne qui a une riche histoire de l'utilisation traditionnelle de la médecine (Jayaprakasha, 2006). Récemment devenue un grand intérêt pour les scientifiques qui se livrent eux même dans la recherche pharmaceutique, nutritionnelle et dans le développement de nouveau médicament en raison de ces multiples distinctif pièces officinale et bioactivité multiples tels que, antidiabétique, antivirale, antibactérien et antioxydant (Rufeng et *al.*, 2010).

Ces plantes sont douées d'un très large éventail d'activités biologiques grâce à leurs métabolites secondaires actifs tels que les composés phénoliques qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique (Zeghad, 2009).

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une valorisation de cette plante médicinale et de découvrir certains constituants de cette plante qui possèdent des activités biologiques.

L'objectif de notre travail vise à quantifier nos extraits en polyphénols et à déterminer leurs propriétés biologiques. La valorisation de cette plante englobe plusieurs aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Le second aspect consacré à une évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'effet de ces extraits sur la flore gastrique.

Notre manuscrit est scindé en deux parties principales

La première consacrée à l'étude bibliographique comporte trois chapitres :

- chapitre I : le grenadier (*punica granatum*)
- chapitre II : les composés phénoliques
- chapitre III : la flore intestinale

La deuxième aborde la partie expérimentale est divisé en trois parties :

- Préparation des extraits phénoliques de la plante étudiée et ces analyses qualitatives et quantitatives
- La mise en évidence *in vitro* du pouvoir antibactérien de ces extraits vis-à-vis les souches bactériennes testées.
- Evaluation *in vivo* de l'effet de l'extrait méthanolique administrée par voie orale aux rats infectés par *Bacillus cereus*.

A la lumière des résultats trouvés, nous aborderons une discussion sur les intérêts et les avantages des tests biologiques réalisés, pour interpréter l'action biologique des composés actifs

Enfin, nous présentons une conclusion générale de ce travail ainsi que les perspectives envisagées.

Chapitre I
Punica granatum (L.)



1. Introduction

Depuis des milliers d'années, le grenadier (*Punica granatum*), ses fruits ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs, sont utilisés, au Moyen-Orient et en Asie, régions dont cet arbuste est originaire, pour leurs propriétés médicinales. La plus ancienne représentation qui nous a été transmise sous forme d'image se trouve dans une tombe de l'époque d'Amenhoteps IV (1375-1358 avant notre ère) près de Tell el Amarna (Egypte) (Benzi , 1999).

D'abord disséminé par les nomades arabes, puis introduit en Chine au début du IIème siècle avant JC, le grenadier est importé à Rome par les Romains de retour des guerres puniques, après leur victoire sur les Carthaginois. Plus tard, le grenadier sera introduit dans la péninsule ibérique, où le nom de son fruit, la grenade, sera donné à l'une des plus grandes villes d'Espagne.

Connu depuis plus de 4000 ans, le grenadier n'a cessé de fasciner toutes les civilisations par sa beauté et la succulence de son fruit, à la symbolique nombreuse. Le calice de la grenade, en forme de couronne, en fait un fruit majestueux.

Ce fruit est mentionné dans le livre sacré du coran comme de nombreuses plantes comestibles et non comestibles sont cités et en faire un fruit du paradis, et la science moderne est venu pour nous révéler quelques-uns des secrets de ce fruit étonnant et de ses avantages Qui suscité l'intérêt de nombreux chercheurs (Ajaikumar , 2005).

1. Origine géographique et aire de répartition du grenadier

1.1 Origine géographique

Punica granatum serait originaire de la région de l'Asie englobant la Géorgie, l'Iran, l'Arménie, l'Azerbaïdjan et l'Afghanistan où il vit couramment à l'état sauvage depuis plus de 4000 ans se distinguant des variétés cultivées par ses épines et les dimensions réduites de ses fruits et forme même des peuplements presque purs. Il est particulièrement abondant dans la zone côtière de la Mer Caspienne. Il se serait répandu en Asie Mineure et dans la région méditerranéenne où il est souvent probablement réalisé en divers lieux indépendants situés à l'intérieur de son aire (Baum , 1988). 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.

1.2 Aire de répartition géographique

Aire de distribution du grenadier comprend le Moyen-Orient, sa terre d'origine. S'étend jusqu'en Inde et Chine ainsi fait le tour de la méditerranéen (Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc) (Boullard , 2001).

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 (Wald, 2009).

1.3 Production de la grenade

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

La production de grenade est en nette augmentation ces dernières années, montrant un regain d'intérêt pour ce fruit oublié depuis plusieurs décennies.

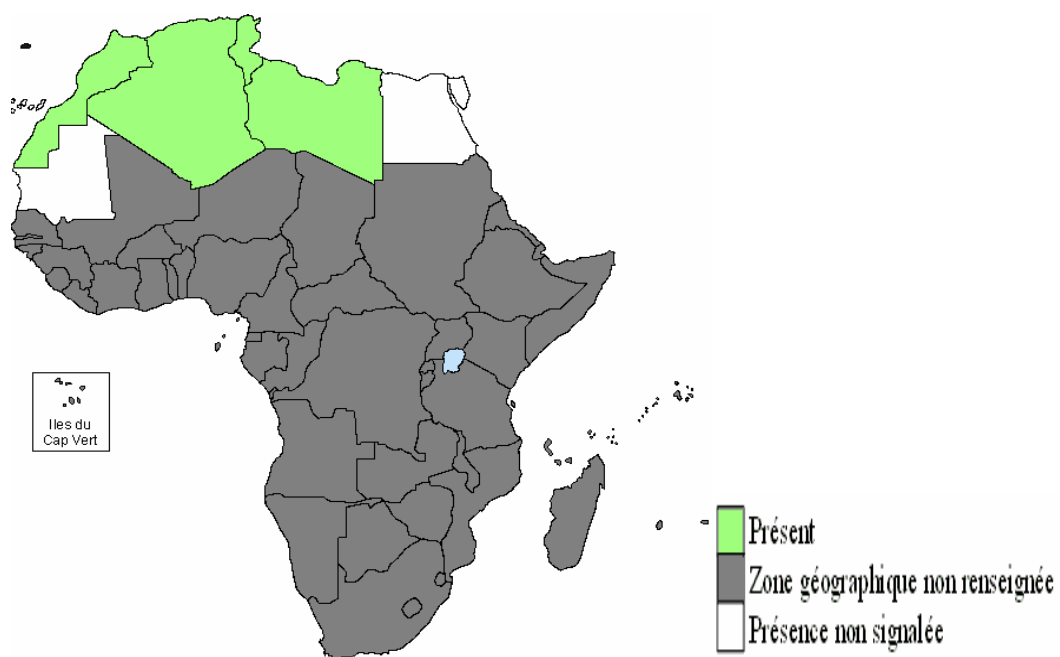


Figure 01: Répartition géographique de la grenade en Afrique.

2. Classification de *Punica granatum*

Le grenadier (*Punica granatum*) a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753 (Tableau 01).

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 représentée dans le tableau 01 (Spichiger, 2004)

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, 2004).

Tableau 01 : Classification botanique de *Punica granatum* (Spichiger, 2004).

	Classification 1753	Classification 2003
Embranchement	Spermaphytes	Angiospermes
Sous-embranchement	Angiospermes	Dicotylédones vraies
Classe	Magnoliopsida	Rosidées
Ordre	Myrtales	Myrtales
Famille	Punicaceae	Lythraceae
Genre	<i>Punica</i>	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica granatum</i>	<i>Punica granatum</i>

3. Autres dénominations

4.1. Synonymes

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 et Baloufié.

De même, la fleur du grenadier est également appelée balauste (Wald, 2009). Aussi, le fruit, la grenade, porte quelquefois le nom de : Pomme vénitienne, Pomme grenade et Pomme de Carthage. Quant au mot malicorium, il désigne l'écorce du fruit du grenadier. (Verbois, 2009).

4.2. Les dénominations communes dans différentes langues :

Selon les langues parlées dans chaque pays, le nom vernaculaire de *Punica granatum* varie. Ainsi le nom de cet arbre sera :

- ✚ En arabe : الرمان
- ✚ En anglais : Pomegranate ou Pome Granate.
- ✚ En allemand : Granatapfelbaum, Granatbaum, Gemeine Granat, Balluster.
- ✚ En espagnol : Granada cultivado, Mangrano.
- ✚ En italien : Granato.
- ✚ En chinois : Ngan Che Lieou, Shi Liu (Verbois , 2009).

4. Description botanique de grenadier

Punica granatum est un petit arbre ou un arbuste pouvant atteindre 8m de haut, caducifolié à branches nombreuses et minces, ascendantes, parfois érigées aux rameaux souvent épineux. Les feuilles ont un pétiole très court et sont entières, opposées, oblongues- elliptiques à obovées lisses et brillantes (Godet , 1991).

Les fleurs hermaphrodites sont terminales, solitaires ou dispersées par paires. Le calice tubuleux est épais, persistant, rouge, pourvu de 5- 6 lobes triangulaires ; la corolle comporte 5 – 7 pétales écarlates et abrite de nombreuses étamines (Ducourthial , 2003).

Le fruit sphérique à oblong, brun rougeâtre ou jaunâtre, à un calice épais, l'exocarpe en est coriace. Des graines nombreuses, anguleuses, au tégument rouge, translucide et juteux, sont renfermées dans deux séries de loges séparées par des parois minces.

Le péricarpe du fruit est une coque épaisse, de consistance dure, de saveur amère et astringente qui varie selon les cultivars poussant dans différentes régions du monde.

Il est très coloré, généralement de teinte brun-rougeâtre (Chakass et al., 2007) ou rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau lisse de teinte blanc-jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé de l'extérieur et d'un beau jaune à l'intérieur du fruit. Erken et Kader (2011), indiquent qu'il existe plusieurs cultivars exceptionnels avec des écorces de fruits de couleur noire.

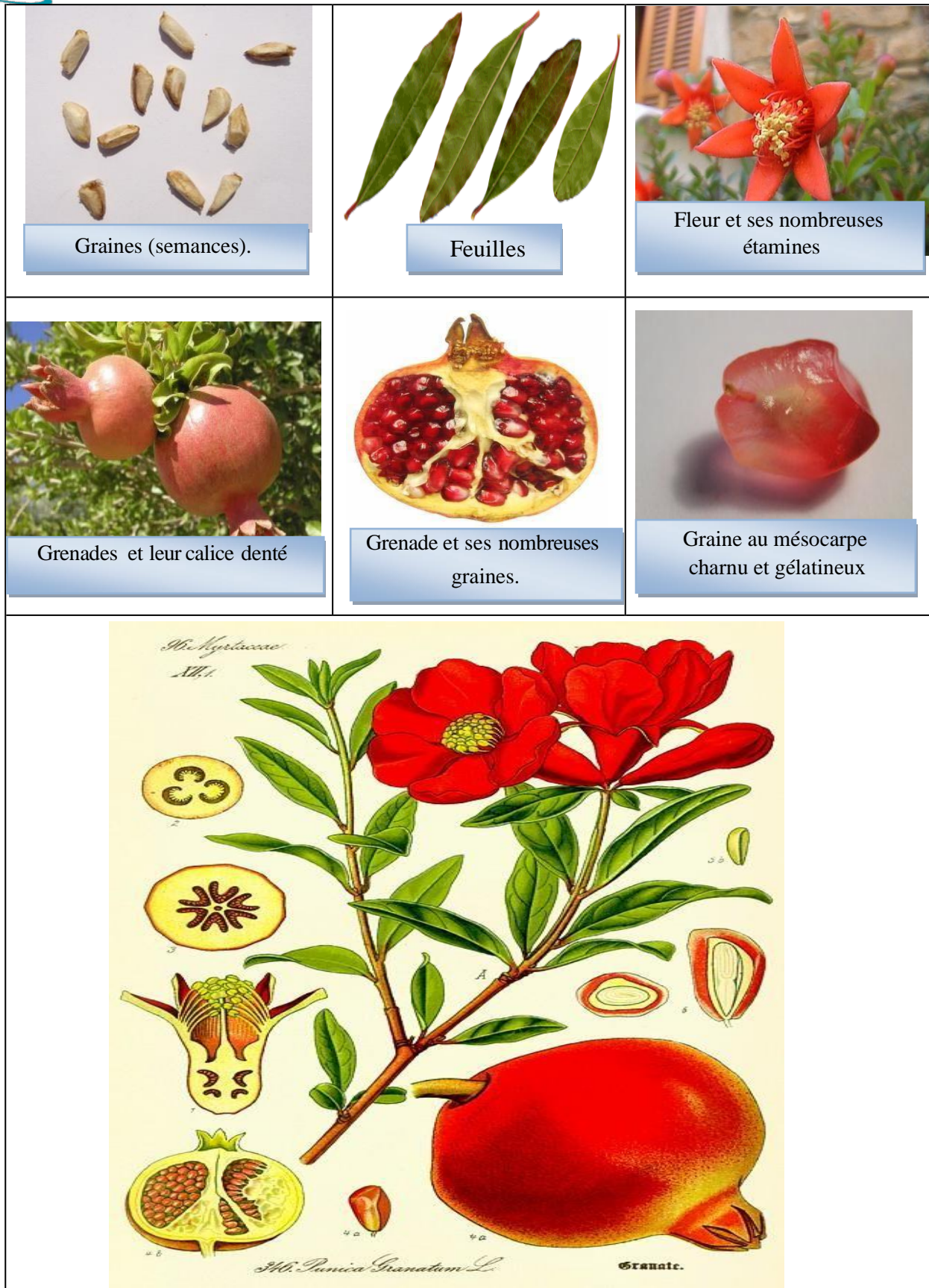


Figure 02 : Cracteristiques botaniques du grenadier

5. Valeur nutritionnelle

Déjà au XIXème siècle, le grenadier suscite un intérêt chez les chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre, tel que la pelletierine. Grâce aux relativement récents procédés d'analyse chimique, comme les techniques de chromatographie, de résonance magnétique ou encore de spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier avec précision la composition des différents organes du grenadier synthétisée dans le tableau 2 (Wald, 2009).

La grenade est une bonne source de fibres alimentaires et de folate et une très bonne source de vitamine C.

Tableau 02 : Valeurs nutritionnelles de la grenade, pour 100g de portion comestible (USDA, 2002).

eau : 81 g	fibres : 1 g	valeur énergétique : 74,2 kcal	valeur énergétique : 315 kJ
protéines : 0,95 g	lipides : 0,3 g	glucides : 16,2 g	sucres simples : 16,2 g
Sels minéraux et oligo-éléments			
potassium : 259 mg	phosphore : 8 mg	calcium : 3 mg	magnésium : 3 mg
sodium : 3 mg	fer : 300 µg	zinc : 120 µg	cuivre : 70 µg
Vitamines			
vitamine C : 11,4 mg	vitamine B1 : 30 µg	vitamine B2 : 30 µg	vitamine B3 (ou PP) : 300 µg
vitamine B5 : 590 µg	vitamine B6 : 200 µg	vitamine B9 (folate) : 6 µg	vitamine B12 : 0 µg
bêta-carotène : 20 µg	rétinol : 0 µg	vitamine E : 0,55 mg	vitamine D : 0 µg

6. Propriétés thérapeutiques :

Le grenadier est utilisé depuis des centaines d'années en médecine traditionnelle. La grande diversité des propriétés qui lui sont attribuées laisse à penser que cet arbre est une véritable panacée.

La grenade renferme de nombreuses vertus : hémostatiques, anti-inflammatoire, antivomitique, antidiarrhétiq, antihémorragiques, antidysentériques, antirhumatismales, emménagogues, antibactériennes, apéritive, échauffante, tonique et refroidissante, elle est l'un des fruits les plus appréciés en Inde tant par ses qualités alimentaires que pour ses capacités curatives (Bernard, 2001).

Antioxydante majeure, diurétique, purgative, antiparasitaire et vermifuge, la grenade protège et purifie le corps, chassant les parasites indésirables de l'organisme et du psychisme.

Consommée en prévention, elle possède des capacités anticancéreuses, ses propriétés thérapeutiques freinant la croissance de certains cancers (prostate, sein). Tonicardiaque, elle renforce l'énergie du cœur, dissipe l'amertume, dissémine les douleurs et les regrets (Verbois , 2009).

Elle régénère les tissus, réduit la pression sanguine systolique et son action astringente agit de façon excellente sur sphère intestinale, qu'elle revivifie. En même temps que l'un des meilleurs remèdes contre le ténia, ou ver solitaire et capable, en décoction, sous forme de tampons vaginaux, de maîtriser des leucorrhées et autres affections vaginales.

Elle est réputée pour posséder le don d'accroître la fertilité et de développer la fécondité, qu'elle soit organique ou créative (Verbois , 2009).

De ces graines on extrait une boisson appelée « sambu », utilisée dans les cures de réjuvenation et de drainage interne, facilitant ainsi l'élimination des surcharges pondérales générées par une désaffection relationnelle ou parentale (Wald , 2009).

10. Toxicité du grenadier

L'écorce du grenadier, au XIXème siècle, souvent utilisée pour ses propriétés anthelminthiques, semble montrer quelques effets secondaires non négligeables. Ainsi, après administration d'une décoction d'écorce de racine, il fut observé, chez plusieurs patients, l'apparition de vertiges, d'étourdissements, d'une sorte d'ivresse, parfois des syncopes, et de légers mouvements convulsifs. Cependant, ces accidents étant fugaces et ne laissant aucune trace après leur manifestation, ils furent tolérés par les médecins de l'époque (Wald , 2009).

Un cas d'intoxication est cependant rapporté. Chez un malade, l'administration de deux doses de 0,30g de sulfate de pelletierine a provoqué une paralysie spasmodique, que les auteurs rattachent directement à l'ingestion du médicament (Seeram et *al.*, 2006).

A photograph of pomegranates and seeds. One pomegranate is whole on the left, another is partially open on the right showing the red seeds, and several seeds are scattered in the foreground. The background is white.

Chapitre II
Substances antimicrobiennes
d'origine végétale

1. Généralités

Le terme polyphénol est introduit en 1980. Il remplace le terme ancien de Tanin végétal. De la lignée des grandes familles de molécules largement présentes dans le règne végétal, on retrouve tout un panel de composés phénoliques allant de molécules simples (acides phénoliques) à des molécules complexes (Tanins) (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (Lebham, 2005) pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. (Urquiaga et Leighton, 2000).

Les polyphénols sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal avec plus de 8000 structures phénoliques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

2. Définition des polyphénols

Nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (Dangles et *al.*, 1992 ; Hagerman et *al.*, 1998 ; Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, libre ou engagé avec des glucides (Bamforth ,2000).

3. Rôle des polyphénols

Comme la majorité des composés secondaires, les polyphénols sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant :

- ✚ Défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes.

- ✚ Dissuasion alimentaire. On parle du phénomène d'allélopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.

- ✚ Attraction des pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.
- ✚ Protections contre les rayonnements UV.
- ✚ Molécules qui donnent des arômes et parfums aux plantes. Ce qui sert principalement à repousser les herbivores. Exemple : les polyphénols des pélagoniums (Druyne, 1999 ; Schiestl *et al.*, 2000 ; Yi-Cai *et al.*, 2000 ; Sasaki et Takahashi, 2002).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers, cardio-vasculaires...) (Macheix *et al.*, 2005).

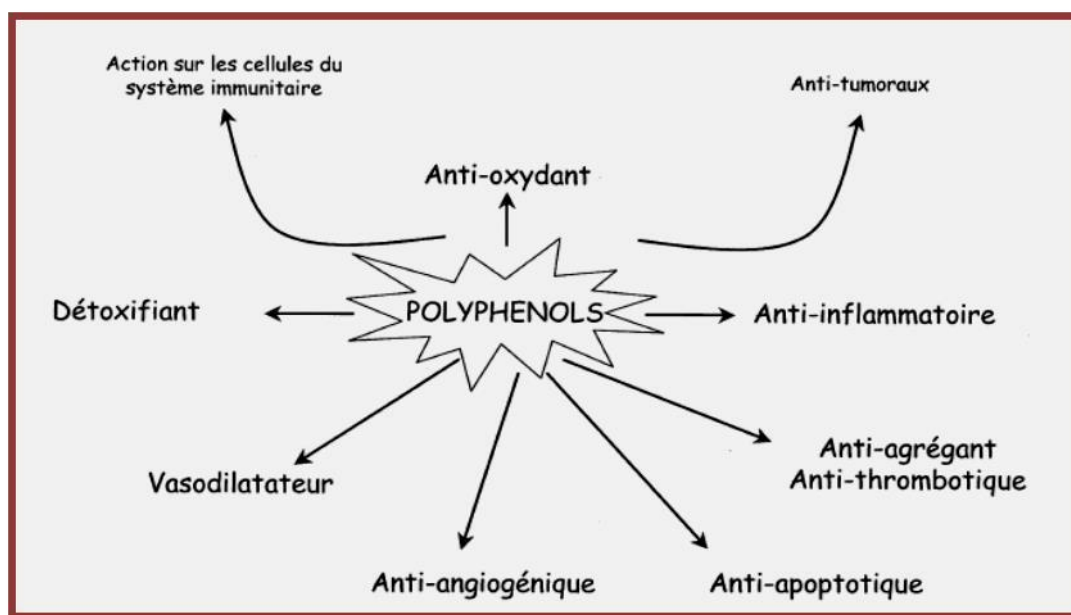


Figure 03 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

4. Classification des composés phénoliques

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 phénols, les flavonoïdes et les tanins.

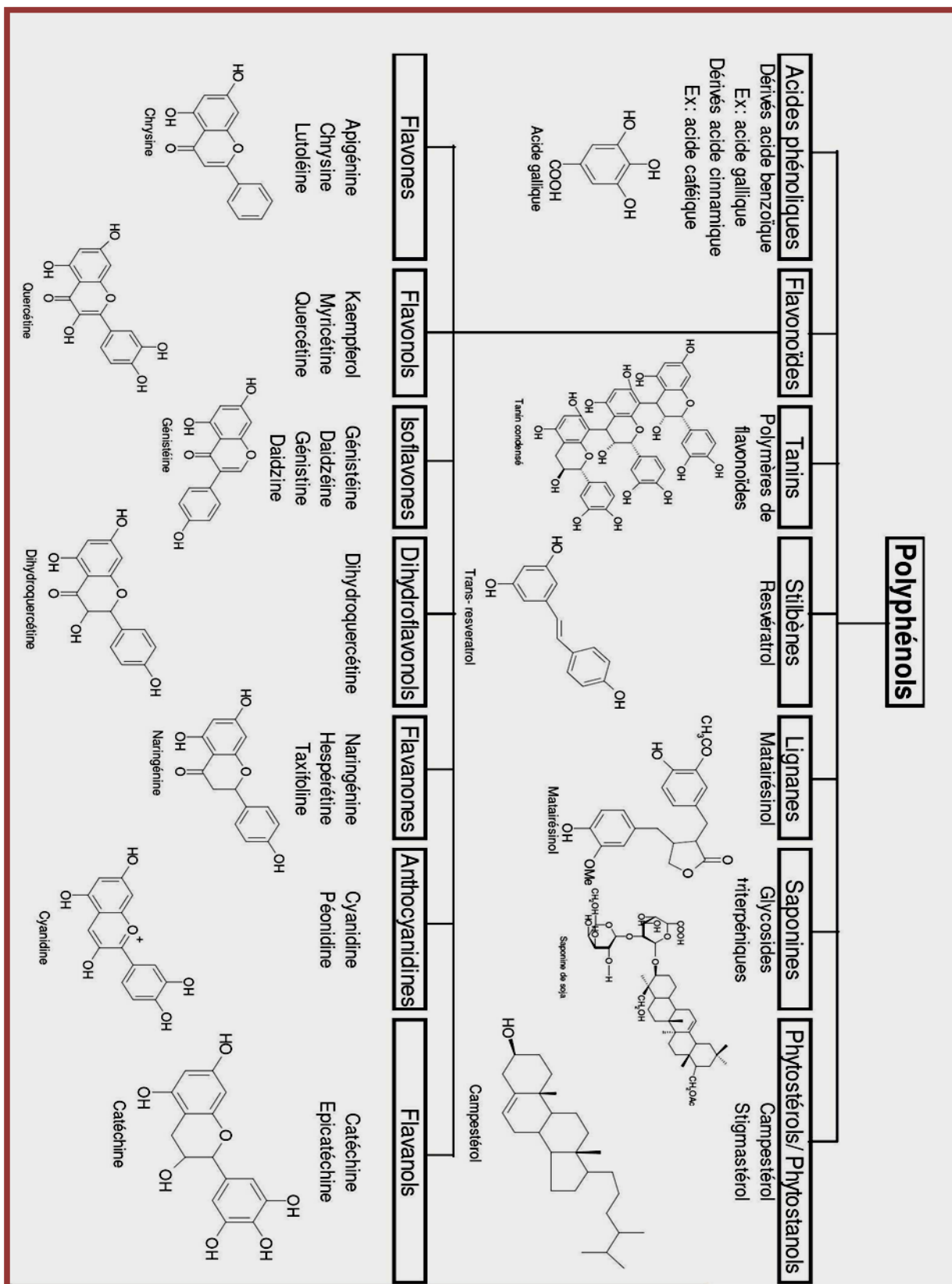


Figure 04 : Classification des polyphénols (Yvon Gervaise M., 2004)

4.1 Les acides phénoliques et les coumarines

4.1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová et al., 2005). Ils ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols.

Ils sont incolores et rares dans la nature. Ce sont les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique.

- *Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque* sont très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides. Ils sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones qui incluse plusieurs molécules et les plus fréquentes sont; L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïque (Nagendran, 2006).

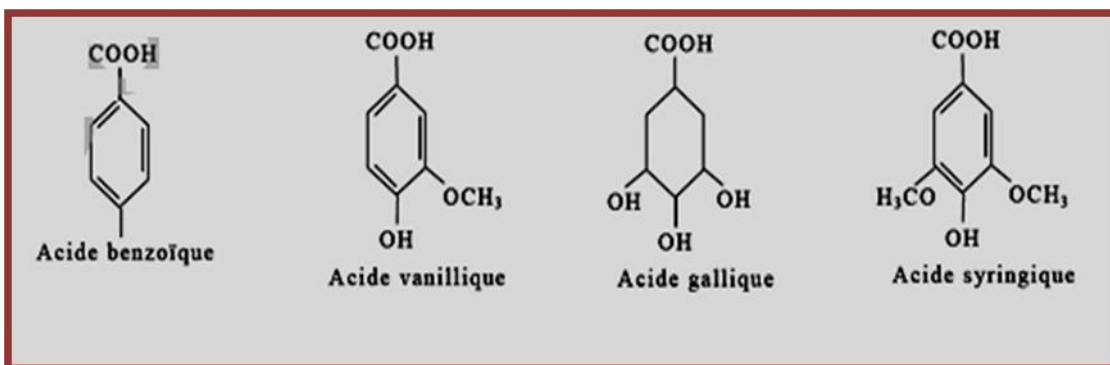


Figure 05 : Exemple de quelques acides phénoliques de la série benzoïque.

- *Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique* sont souvent estérifiés et possèdent une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide saticylique, l'acide caféïque, l'acide p-coumarique et l'acide sinaptique (Newsletter, 2005).

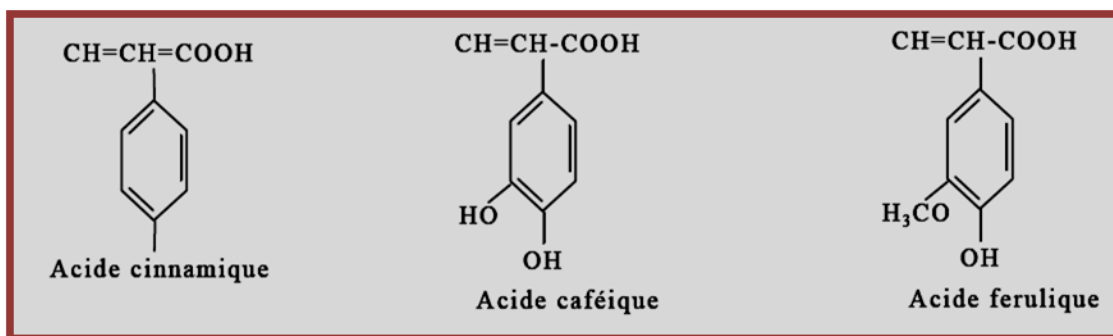


Figure 06 : Exemple de quelques acides phénoliques de la série cinnamique.

4.1.2. Les coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorota* Wild., Fabaceae) d'où fut isolée en 1982 (Bruneton, 1993). Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Ford *et al.*, 2001).

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont : les légumineuses, Rutacées, Apiécées. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Guignard, 1998 ; Deina *et al.*, 2003 ; Booth *et al.*, 2004).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée, cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Hofmann, 2003).

On peut classer les coumarines en cinq catégories (Guignard, 1998, Deina *et al.*, 2003, Booth *et al.*, 2004).

1. **Coumarines simples** : Coumarines, Umbelliférone.
2. **Coumarine prénylées** : Rutaculine, Osthol.
3. **Furanocoumarines** : Furanocoumarines linéaires (Bergaptène, Imperatorine) et Furanocoumarines angulaires (Angelicine, Pimpinéline).
4. **Pyranocoumarines** : La visnadine.

Les coumarines peuvent également exister à l'état dimérique ou trimérique

5. **Dicoumarines** (coumarines dimérique) ; Dicoumarol.
6. **Tricoumarines** : Triumbellatine.

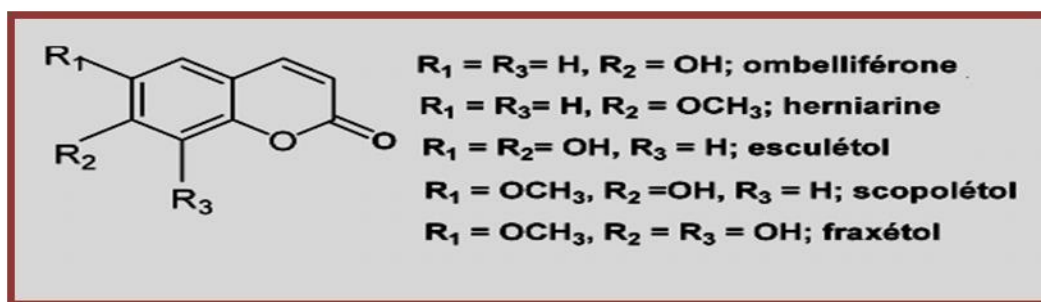


Figure 07 : Quelques exemples des principaux types de coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

4.2. Les flavonoïdes

Ce sont des composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour (Alan et Miller, 1996 ; Rajnerayanama et *al.*, 2001). Ce sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets (Bruneton, 1993 ; Rajnerayanama et *al.*, 2001). Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides (Fiorucci, 2006).

Ces molécules ont un poids moléculaire faible, consiste à 15 atomes de carbones arrangés comme suit : C₆-C₃-C₆ sont composés de deux noyaux aromatiques A et B, liés par un pont de 3 carbones souvent sous forme d'un hétérocycle (Nagendran et *al.*, 2006).

Les substitutions variées au sein de l'hétérocycle C donnent les différentes sous classes des flavonoides :

- **Flavonols**: quercétine, myricétine, rutine, kaempférol...
- **Flavones** : apigénine, lutéoline...
- **Flavanones** : eriodictyol, naringine, naringénine...
- **Isoflavones** : génistéine, daidzéine...
- **Anthocyanidines** : alpha-tocophérol, malvidine, cyanidine, delphinidine, pélargonidine, (Sarmi et Cheymer, 2006).

De plus, le noyau pyranique central peut être ouvert (chalcones) et recyclisé en un noyau furanique (Bruneton, 1999 ; Marfak, 2003 ; Skerget et *al.*, 2005).

Les flavones, et les flavonols sont les plus connus grâce à leur pouvoir antioxydant élevé, et les plus divers sur le plan structural. Les substitutions touchant les noyaux A ou B qui peuvent parvenir dans chaque classe des flavonoides sont : une oxydation, alkylation, glycosylation, acylation, et sulfation.

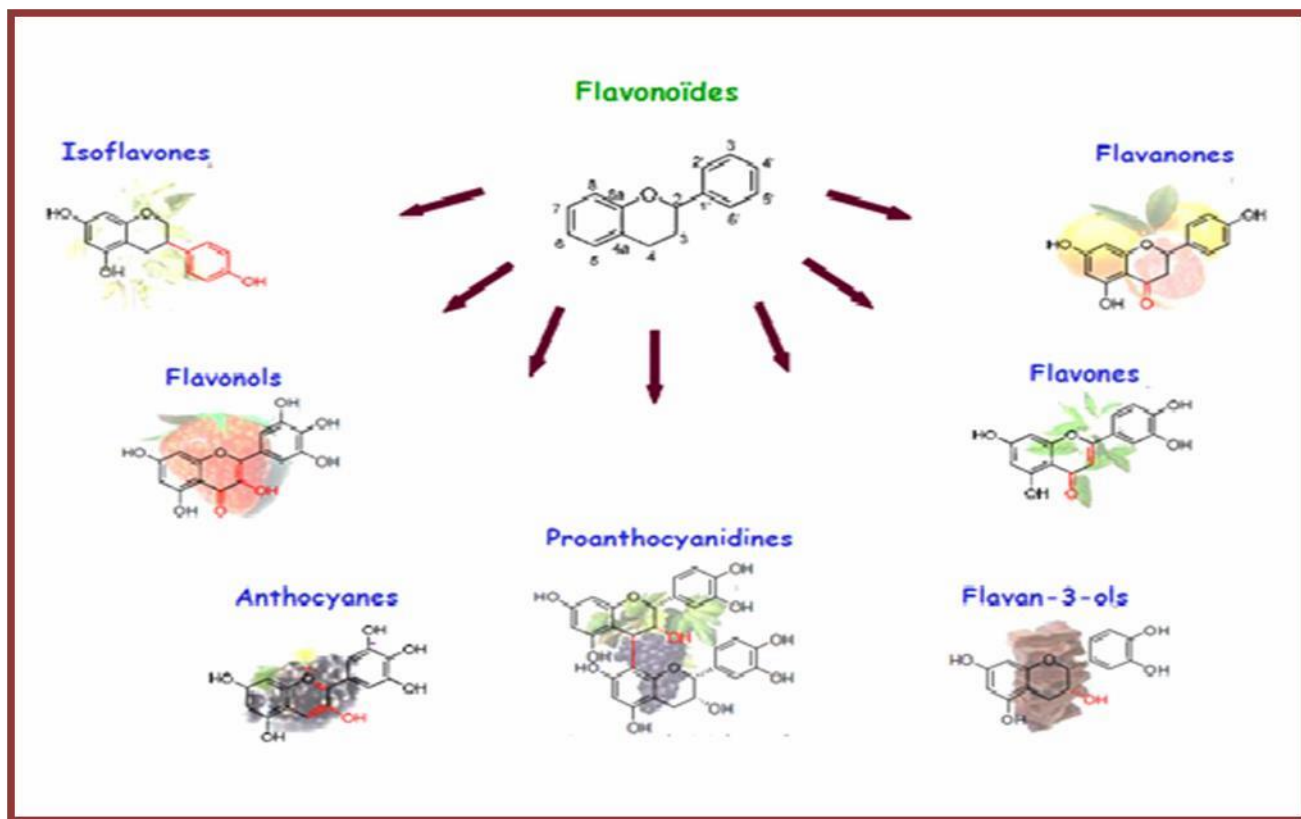


Figure 08 : Définition des différents types de flavonoïdes (Hummer et *al.*,2008).

4.3. Les tanins

Le mot tanin fait référence à un large groupe de composés (poly) phénoliques naturellement produits par les plantes. Ces composés, solubles dans l'eau, se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables. Ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire généralement compris entre 500 et 3000 Da (Zhu et *al.*,1997 ;Makkar , 2003).

Du point de vue structural, les tanins constituent un groupe chimique hétérogène, avec des structures moléculaires variées. En général, ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule (Khababae et Van Ree , 2001).

4.3.1. Les tanins hydrolysables

Ce sont des hétéropolymères possédant un noyau central constitué d'un polyol. Il s'agit souvent d'un D-glucose sur lequel les groupements hydroxyles sont, en partie ou en totalité, estérifiés avec l'acide gallique (cas des gallotannins) ou un dimère de l'acide gallique qui est l'acide hexahydroxydiphénique (cas des ellagitannins) (Figure 9).

Comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques (Leinmüller et al.,1991).

4.3.2. Les tanins condensés

Les tanins condensés sont chimiquement définis comme étant des oligomères ou des polymères d'unités flavanoïdes. Les monomères précurseurs de ces molécules sont les flavan-3-ols (catéchine) et/ou les flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines), liés entre eux par des liaisons carbone-carbone très résistantes à l'hydrolyse (Figure.9). Les tanins condensés sont appelés proanthocyanidines parce que leur oxydation en milieu alcool-acide entraîne la formation de pigments anthocyanidiques tels que les cyanidines (à partir de procyanidines) et les delphinidines (à partir de prodelphinidines). Les anthocyanidines sont responsables de la coloration variée des fleurs, des feuilles et des fruits en rose, rouge, mauve, violet et bleu. Leur présence dans les plantes est, de ce fait, détectable à l'oeil nu (Leinmüller et al.,1991 ;Hedqvist , 2004).

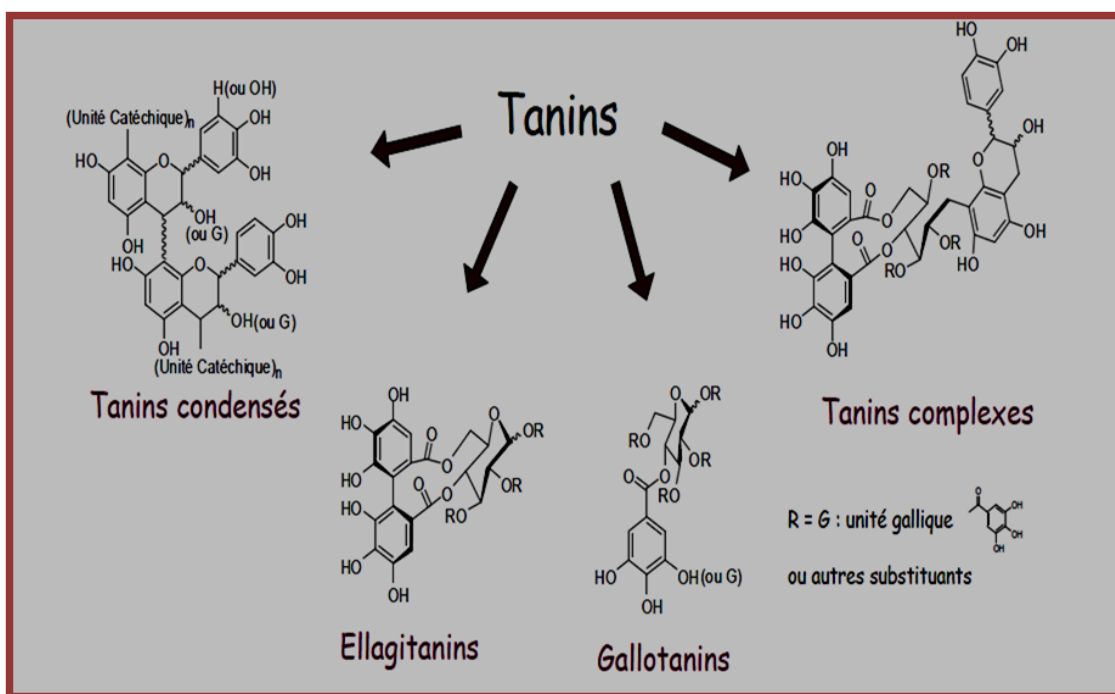


Figure 09 : Classification des tanins (Hedqvist , 2004).

5. Intérêts des composés phénoliques

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets sur la santé. En effet leurs rôles d'antioxydants naturels suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, des maladies cardiovasculaires, des maladies neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique le tableau suivant, englobe les activités biologiques des polyphénols les plus importantes :

Tableau 03: Activités biologiques des composés polyphénoliques (Frankel et *al.*, 1995).

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants	[Didry et <i>al.</i> , 1982] [Ravn et <i>al.</i> , 1984] [Hayase et Kato, 1984]
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses	[Mabry et Ulubelen, 1980]
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants	[Stavric et Matula, 1992] [Das et <i>al.</i> , 1994] [Bidet et <i>al.</i> , 1987][Bruneton, 1993] [Aruoma et <i>al.</i> , 1995]
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires	[Bruneton, 1993]
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongiques Anti- inflammatoires	[Masquelier et <i>al.</i> , 1979] [Bahorun et <i>al.</i> , 1996] [DE Oliveira et <i>al.</i> , 1972] [Brownlee et <i>al.</i> , 1992] [Kreofsky et <i>al.</i> , 1992]
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydants	[Okuda et <i>al.</i> , 1983] [Okamura et <i>al.</i> , 1993]

6. Polyphénols de grenade

Parmi les substances végétales secondaires de la grenade, on trouve un taux très élevé de polyphénols glucoconjugués. Parmi les polyphénols de la grenade, on compte les acides carbo-phénoliques (acide ellagique, acide gallique, acide caféïque, acide chlorogénique), les ellagitanines (comme la punicalagine) et des flavonoïdes (comme la catéchine, la quercétine, le camphre, la lutéoline et d'anthocyanes).

Dans le fruit comme dans le jus, les polyphénols présents sont liés essentiellement à des molécules de sucre. Pour être résorbés correctement par notre intestin et pouvoir déployer leurs effets santé, ces liaisons glucosidiques doivent être scindées et les molécules complexes liées sucre décomposées, dégradées en plus petites molécules. Les ellagitanines quantitativement très importantes dans la grenade (molécules complexes d'acide ellagique polybrochuremère) doivent d'abord être déstructurées par des enzymes. Ce qui importera alors surtout pour bénéficier des effets santé du fruit, ce sera la qualité des processus de fermentation de la flore intestinale (Cerde et *al.*, 2004 ;Cerde et *al.*, 2005).

Tableau 04: Composition phénolique du pur jus de grenade

ACIDES-PHENOLS en mg/100g MF		
ACIDES HYDROXYBENZOIQUES acide ellagique : 2,06 glucoside d'acide ellagique : 3,97 acide gallique : 0,45 galloyl glucose : 4,81 punicalagine : 43,60	ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES acide 5-caféylquinique : 0,12 acide caféique : 0,07 acide o-coumarique 0,01	
FLAVONOIDES, en mg/100g MF		
FLAVANOLS (+)-catéchol : 0,37 (-)-épicatéchol (-)-épigallocatechol (+)-gallocatechine	ANTHOCYANIDOLS (instables) Delphinidol cyanidol, Pélargonidol	DIHYDROCHALCONES (sous forme hétéroside) phloridzine : 0,10
PROANTHOCYANIDOL S oligomères (mg/100 g d'arille) (astringence) Procyanidol B1 : 0,13 Procyanidol B3 : 0,16	ANTHOCYANOSIDES (pigment rouge) delphinidol 3-glucoside : 1,36 delphinidol 3,5-diglucoside : 1,56 cyanidol 3-glucoside : 3,43 cyanidol 3,5-diglucoside : 3,39 pélargonidol 3-glucoside : 0,33 pélargonidol 3,5-diglucoside : 0,06	FLAVONOL quercétol : 0,25

6.1. Activité neuroprotectrices

Il est récemment apparu que les polyphénols de grenade développent une activité antioxydante protectrice du système nerveux. L'état actuel des données brochure grenade laisse entrevoir un potentiel prometteur dans le domaine de la prévention des attaques d'apoplexie, du Parkinson, de l'Alzheimer et de la sclérose. Dans une étude in vivo de Loren et al. (2005) l'incidence de lésions cérébrales chez le nouveau-né dues au manque d'oxygène pendant l'accouchement a été réduite de 60% par rapport au groupe contrôle par une consommation régulière de jus de grenade. Les lésions cérébrales dues à un manque d'oxygène qui apparaissent suite à des dégâts causés aux cellules par des radicaux libres jouent un grand rôle chez les nouveau-nés comme après des attaques d'apoplexie (Loren et al., 2005).

Selon les avancées actuelles de la médecine, l'Alzheimer et le Parkinson sont soit d'origine héréditaire soit la conséquence d'un stress oxydatif et de processus inflammatoires. Une étude de Hartmann a démontré que le jus de grenade réduit de 50% le dépôt de la protéine bêta-amyloïde dans le cerveau. Celle-ci joue un rôle décisif dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Hartmann, 2006).

On a découvert en outre que les polyphénols de grenade inhibent la production de TNF-alpha dans les cellules inflammatoires au niveau du cerveau (Jung et al., 2006). Et de

nouveau les effets neuroprotecteurs du jus de grenade s'expliquent aussi probablement par une action favorable sur les voies de signalisation cellulaires, les systèmes enzymatiques ainsi que sur la régulation traductionnelle de l'information génétique (Hartmann, 2006).

6.2. Activité protectrice de l'estomac et du foie

Evidemment, d'autres organes peuvent aussi profiter de l'effet protecteur antioxydant des polyphénols de grenade : ainsi, on a constaté de forts effets protecteurs antioxydants sur la muqueuse de l'estomac contre les ravages de l'alcool et de l'acide acétylsalicylique (Ajaikumar et al., 2005) ainsi que sur le foie (Kaur et al., 2006). Ces effets peuvent protéger le foie contre les conséquences d'inflammations et de séquelles dues, entre autres, à l'alcool (par exemple : cancer et cirrhose).

6.3. Activité anti-inflammatoire

Les processus inflammatoires sont étroitement liés à l'oxydation excessive. L'inflammation provoque en effet un stress oxydatif qui épuise nos réserves en antioxydants.

Les polyphénols de grenade permettent non seulement de lutter efficacement contre les radicaux libres par le renforcement des systèmes de protection du corps mais également d'inhiber le processus inflammatoire. L'effet anti-inflammatoire du jus de grenade s'explique notamment par leur action inhibitrice sur plusieurs facteurs responsables de l'inflammation :

- ✚ Inhibition des protéines pro-inflammatoires NFkappa- B (nuclear factor Kappa-B) et TNF-alpha, qui provoquent l'apparition de phénomènes inflammatoires, de maladies autoimmunes, et le développement de certains cancers. (Khan et al., 2007 ; Syed et al., 2006 ; Huang, 2005 ; Ahmed et al., 2005 ; Afaq et al., 2005 ; Schubert et al., 1999 et 2002).
- ✚ Inhibition de l'enzyme pro-inflammatoire COX-2 (cyclooxygénase) (Adams et al., 2006 ; Schubert et al., 1999).

6.4. Activité préventive des maladies cardiovasculaires

Une des causes principales des maladies cardiovasculaires est l'athérosclérose. Il s'agit d'un phénomène provoqué par le dépôt de cholestérol LDL sur les parois vasculaires, diminuant leur élasticité et rétrécissant le passage du sang. Si elle n'est pas traitée, l'athérosclérose peut provoquer de l'hypertension artérielle, des infarctus et des attaques cérébrales.

Il a été démontré que les polyphénols de jus de grenade exercent des effets protecteurs importants au niveau cardiovasculaire :

- ✚ Diminution du risque d'infarctus (Sumner, 2005).
- ✚ Diminution des facteurs d'athérosclérose (Aviram et al., 2004). ✚
Diminution de la pression artérielle (Aviram et al., 2004)
- ✚ Diminution de l'oxydation du cholestérol LDL et total (Aviram et al., 2004).

L'étude d'Aviram *et al* (2004). (Randomisée contre placebo) chez des patients atteints d'un rétrécissement de la carotide a montré qu'après un an de consommation de jus de grenade concentré (50 ml/jour) les dépôts dans l'artère carotide ont diminué de 35%, la pression artérielle a baissé de 12% et l'oxydation du cholestérol LDL a diminué de 90% (Aviram et al., 2004).

6.5. Activité préventive d'arthrite

Des études pré-cliniques actuelles montrent que les polyphénols de grenade peuvent combattre la dégénérescence inflammatoire du tissu cartilagineux en particulier en cas d'arthrite rhumatoïde (Salahuddin et al., 2005 ; Shukla et al., 2008) Dans le cas d'arthrite rhumatoïde, le tissu cartilagineux des articulations est endommagé et détruit par des processus inflammatoires. On a démontré ici que les polyphénols de jus de grenade lyophilisés inhibent la formation des protéines inflammatoires (par ex. COX2, MAP kinases, TNF-alpha) et la distribution de substances pro-inflammatoires (interleukine-6, prostaglandine E2) et protègent ainsi le cartilage. Les polyphénols de grenade ont pu atténuer nettement le déclenchement et la gravité de la crise d'arthrite.

La dégénérescence des os et des cartilages était plus faible que dans le groupe témoin. En outre, les polyphénols de jus de grenade lyophilisés influent sur l'inflammation du cartilage, foyer de l'arthrite, via encore d'autres mécanismes (Salahuddin et al., 2005).

Les polyphénols freinent la formation des métalloprotéases qui sont en grande partie responsables de la destruction du cartilage. Ces résultats pourraient signifier un gain de mobilité et de qualité de vie pour les patients atteints d'arthrite (Salahuddin et al., 2005).

6.6. Activité antidiabétique

Même si le jus de grenade est naturellement constitué d'une forte concentration de glucides (65 gr de fructose pour 135 gr de jus, valeur 100 ml, soit une densité de 1,35), il a, sur les diabétiques, un effet bénéfique vasoprotecteur et provoque une réduction du cholestérol. Dans la grenade, les molécules de sucre naturel sont liées en grande partie à des polyphénols antioxydants.

Rosenblat *et al* (2006) ont démontré que le jus de grenade ne provoque pas d'augmentation du taux de glycémie, du cholestérol, des lipides et des acides gras chez les

diabétiques, mais a un effet tout à fait positif sur leurs taux dans le sang tout en diminuant nettement le stress oxydatif .

Etant donné les risques cardiovasculaires encourus en raison de leur métabolisme modifié, l'effet vasoprotecteur des polyphénols du jus de grenade est très bénéfique aux diabétiques. Des patients atteints d'un diabète de type 2 non insulino-dépendant ont bu pendant 3 mois 50 ml de jus concentré de grenade tous les jours. Des effets antioxydants et vasoprotecteurs évidents ont été mesurés dans le sérum et dans les phagocytes (macrophages). Rozenberg et ses collaborateurs (2006) ont montré que l'effet vasoprotecteur du jus de grenade est imputable surtout à la forme gluco-conjuguée des polyphénols.

En outre, le métabolisme du cholestérol total semble être favorablement influencé. 22 diabétiques souffrant de troubles du métabolisme des lipides et d'hypercholestérolémie ont bu 30 ml de concentré de jus grenade par jour (Esmailzadeh *et al.*, 2006). Après 8 semaines on a constaté une diminution notable du cholestérol LDL et du cholestérol total. Les triglycérides et la fraction HDL n'ont pas été modifiés.

6.6. Activité anticancéreuse

Les cellules cancéreuses ont la capacité de redevenir des cellules saines par un processus appelé différenciation. Les flavonoïdes peuvent induire cette différenciation avec une toxicité plus faible que les rétinoïdes, ce qui les rend intéressant pour le traitement de la leucémie, mais aussi des cancers du sein ou de la prostate.

Ainsi, les fractions riches en polyphénols de grenade ont une activité anti-proliférative, anti-invasive, anti-eïcosanoïde, anti-angiogène et pro-apoptose sur des cellules cancéreuses de sein et de prostate. Une étude réalisée sur des promyélocytes humains de leucémie (HL-60) montre que des extraits riches en flavonoïdes obtenus l'un à partir de jus de grenade fermenté et l'autre à partir de péricarpe de grenade sont fortement promoteurs de différenciation alors que l'extrait de jus de grenade frais a un effet plutôt faible. Les extraits de grenade ont aussi une action inhibitrice de la prolifération des cellules cancéreuses, les extraits de jus fermenté et de peau de grenade étant plus efficaces (Kawaii , 2004).

Quatre espèces chimiques pures toutes présentes dans la grenade, l'acide ellagique, l'acide caféique, la lutéoline et l'acide punique, ont été testé en tant qu'inhibiteurs de la croissance *in vitro* de cellules cancéreuses humaines de prostate (PC-3). Chaque molécule (4µg/mL) inhibe de manière significative la prolifération des cellules cancéreuses et lorsque l'acide

caféique, l'acide pucinique et la lutéoline sont utilisés en combinaison au mêmes concentrations une inhibition supplémentaire est observée (Lansky ,2005).

Seeram *et al.* ont par ailleurs montré que les différents antioxydants du jus de grenade agissent de manière synergique puisque le jus de grenade a une activité antioxydante plus élevée qu'un extrait de tanins de grenade totaux seul, que la punicalagine seule et que l'acide ellagique seul. Ainsi le jus de grenade a la plus forte activité antiproliférative sur des lignées cellulaires de cancer du côlon (inhibition de 30 à 100%) (Seeram , 2005).

6.7. Activité cicatrisante

Comparé à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de peau de grenade (44% de composés phénoliques) à 5% permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de 10 jours, les rats traités au gel à l'extrait de peau de grenade sont guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins. Les analyses par HPLC montrent que les composants majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (Murphy , 2004).

6.8. Activité antivirale

Une étude récente (Haidiri *et al.*, 2009) montre que les polyphénols de grenade ont non seulement un effet anti-inflammatoire mais qu'ils tuent même le virus de la grippe Influenza-A et inhibent sa multiplication ; ils renforcent l'efficacité d'un traitement à l'oseltamivir (Tamiflu®).

Les polyphénols de grenade ont aussi des effets antivirale intéressants contre les virus HIV-1 (Neurath *et al.*, 2004 et 2005).

7. Toxicité des polyphénols de grenade

Il a été dit que la punicalagine, tanin ellagique hydrosoluble et polyphénol antioxydant très abondant dans le jus de grenade (≥ 2 g/L), était toxique pour le bétail. Une étude a donc été réalisée sur des rats Sprague-Dawley pour évaluer la toxicité potentielle de ce composé via un régime enrichi en punicalagine à 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 adverse significatif. Cela pourrait être dû à la plus faible valeur nutritionnelle de la ration enrichie en punicalagine ainsi qu'à sa moindre 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 (Cerda ,2003)

8. Biodisponibilité des polyphénols de grenade

Des scientifiques ont recréé in vitro les conditions physiologiques de l'estomac et de l'intestin grêle pour étudier les conditions de libération des anthocyanes, de la vitamine C et des phénols totaux contenus dans le jus de grenade ainsi que les transformations subies pendant la digestion. D'après cette étude de Perez-Vicente (2002) ,il apparaît que les composés phénoliques de la grenade sont biodisponibles en proportion assez élevées (29%). Cependant, à cause du pH, les anthocyanes seraient pour la plupart transformés et/ou dégradés (97%) tout comme la vitamine C (>95%) (Vicente ,2002).

Dans une autre étude menée par Seeram *et al.*, une analyse de sang a été effectuée chez un sujet ayant consommé 180 mL de jus de grenade contenant 25 mg d'acide ellagique et 318 mg de tanins ellagiques hydrolysables (majoritairement des punicalagines). Une concentration plasmatique maximale d'acide ellagique de 31,9 ng/mL est détectée 1h après ingestion du jus et au bout de 4h il n'y en a plus trace (Seeram ,2004).

Chapitre III
La flore gastrique



Le microbiote intestinal est un écosystème extrêmement complexe, comportant environ 10^{14} microorganismes, estimés à 1,5 kg, recouvrant près de 400 espèces bactériennes, soit, suivant l'âge, dix à 20 fois le nombre de cellules de l'organisme. C'est dire l'importance de ce « monde microbiologique vivant », que nous abritons (Goulet, 2009). C'est un élément actif de la physiologie intestinale, avec des fonctions métaboliques, de flore de barrière et de stimulation du système immunitaire intestinal (Campeotto *et al.*, 2007).

1. Classification de la flore intestinale

La microflore intestinale compte trois groupes de microorganismes : les résidents, les intermédiaires, et les transitoires encore appelés : dominants, sous dominants et flore de passage. Chaque groupe agit, ensemble ou séparément, selon l'étage intestinal où il se situe, mais tous interviennent sur les fonctions physiologiques de l'intestin (Rollan, 1997).

La flore intestinale normale, également appelée flore autochtone ou résidente, comprend des espèces présentes de façon constante dans le tube digestif et capable de s'y multiplier, s'opposant à une flore de passage dite allochtone correspondant aux espèces bactériennes, fongiques ou protozoaires qui traversent le tube digestif sans pouvoir le coloniser sauf lors de circonstances pathologiques. Très polymorphe, cette flore est représentée par des entérobactéries du genre *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, des *Pseudomonas*, des *Staphylococcus* et des *Candida* (Cano *et al.*, 2007).

La microflore autochtone sera présente tout le long de notre vie, fixée préférentiellement dans les cryptes intestinales, elle participe au processus d'absorption en stimulant le renouvellement plus rapide des entérocytes, en augmentant la taille des villosités intestinales ; ce qui a pour effet d'accélérer le transit duodéal. Cette stimulation libère des cellules mortes et leur cortège de vitamines et d'acides aminés, qui pourront être absorbés par les cellules de la muqueuse jéjunale (Rollan, 1997). Elle se répartit entre flore dominante, essentiellement constituée de germes anaérobies stricts (*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* *Clostridium* et *Bifidobacterium* principalement) et la flore sous-dominante, constituée de bactéries aéro-anaérobie facultatives (*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactobacillus* principalement) (Cano *et al.*, 2007).

La microflore intermédiaire encore dite transitoire est la microflore acquise par l'alimentation, le mode de vie, elle est changeante tout le long de notre vie selon notre environnement, et nos conditions socio-professionnelles. En effet, elle est plus ou moins fixée sur les villosités intestinales en renouvellement permanent. L'acceptation par la microflore résidante de cette flore intermédiaire entraîne « l'effet de barrière », c'est-à-dire d'une part l'impossibilité pour la flore de passage de rester et d'autre part la protection contre les infections des germes exogènes (Rolland, 1997). La flore sous dominante présente environ 10^6 à 10^8 UFC/g, elle se compose de bactéries aéro-anaérobies facultatives, appartenant à différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* et aux genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*. Une multiplication exagérée et non contrôlée des bactéries de cette flore, appelée pullulation bactérienne, peut être à l'origine d'effets pathogènes (Wilson, 2005).

2. Répartition topographique de la flore intestinale

La flore intestinale varie longitudinalement tout le long de l'intestin et transversalement entre lumière et muqueuse intestinale. En fonction des niveaux de l'intestin se situent des niches écologiques spécifiques. Elle se densifie de l'intestin grêle à motricité importante au côlon à motricité réduite (Rambaud *et al.*, 2004).

Chez un individu donné, la flore colique gauche est très stable, alors que celle du côlon droit, largement influencée par les substrats qu'elle reçoit, est plus variable (Goulet, 2009). De nombreux facteurs sont impliqués dans le contrôle de la stabilité du microbiote intestinal tel que le pH intestinal, le potentiel redox, l'interaction microbienne, le péristaltisme, les acides biliaires, le mucus, la pharmacothérapie, les défensines et les réponses immunitaires (Ojetti *et al.*, 2009).

Dans l'ensemble, la distribution de la flore intestinale dépend essentiellement du pH et du gradient d'oxygène. Un gradient croissant du nombre des espèces est observé de l'estomac vers le côlon. Le pH, très bas dans l'estomac (pH 2), augmente progressivement jusqu'au voisinage d'un pH 7-8 dans le côlon distal. Ce gradient est créé par les cellules de notre organisme, via la sécrétion d'acide gastrique, mais également via le métabolisme de la flore elle-même (Burcelin *et al.*, 2009).

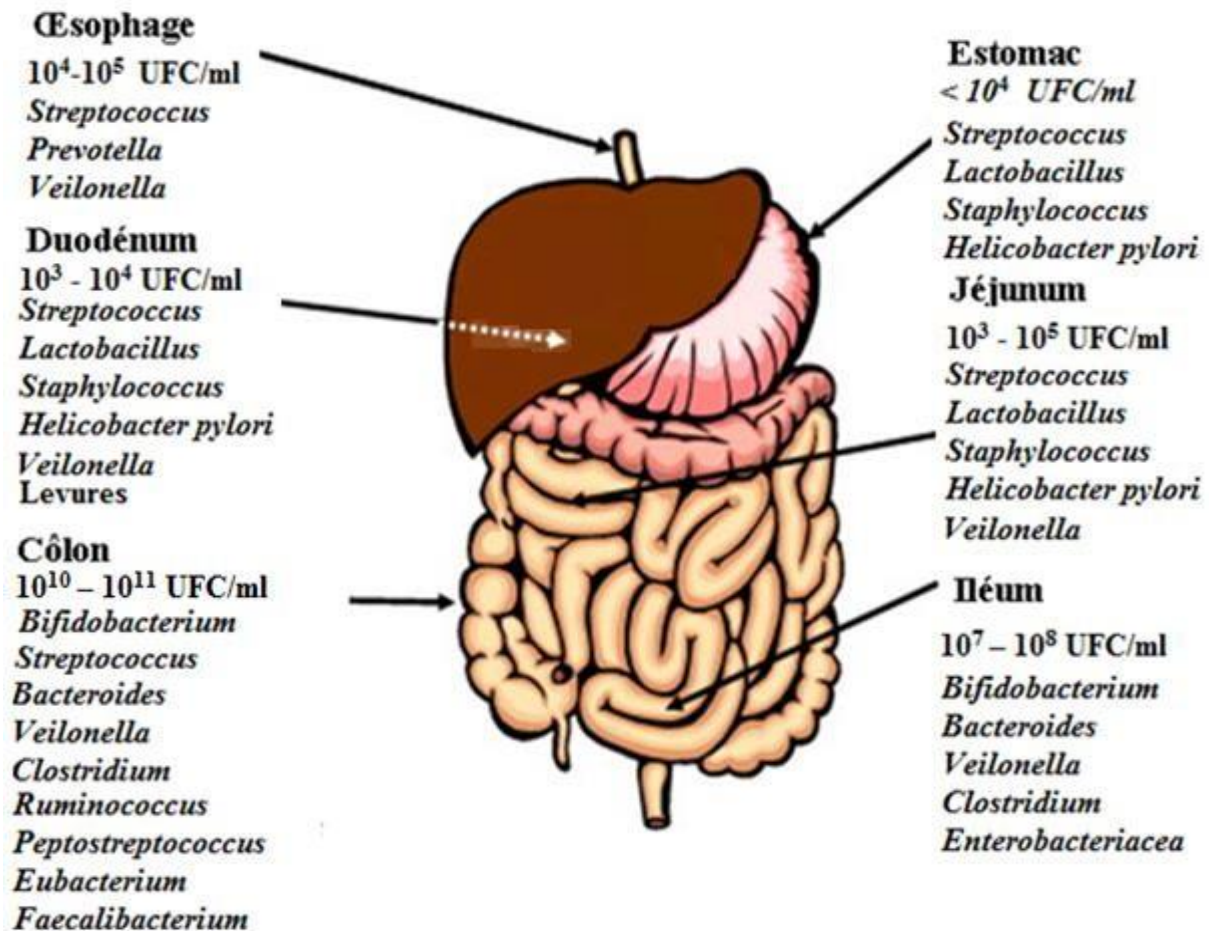


Figure 10. Flore intestinale dans les différents compartiments du tractus gastro-intestinal (Tiihonen *et al.*, 2010).

Les bactéries lactiques, comportant notamment le genre des lactobacilles et des bifidobactéries, sont davantage présentes dans la partie de l'intestin grêle correspondant au jéjunum et à l'iléon. Le gradient d'oxygène décroît tout au long du tube digestif. Ainsi, des bactéries à fort métabolisme oxydatif (aérobie) se retrouvent dans l'intestin proximal et dépriment le milieu environnant en oxygène. Cette caractéristique permet aux bactéries anaérobies facultatives de se développer, puis à la flore anaérobie de proliférer dans l'intestin distal.

La dépression en oxygène, induite par le métabolisme oxydatif de certains genres bactériens, laisse la place à l'utilisation des nitrites et des sulfites comme accepteurs d'électrons puisés dans le milieu intestinal en remplacement de l'oxygène. Ces sulfites peuvent être issus de l'alimentation ou également produits par les bactéries avoisinantes. Il est donc concevable que cette écologie mutualiste entre les bactéries soit le siège d'un équilibre très bien orchestré entre les différents genres bactériens (Burcelin *et al.*, 2009).

2.1. Estomac

En raison de son pH très acide et du contenu gastrique, l'estomac contient habituellement moins de 10 bactéries viables par ml du fluide gastrique. Ce sont surtout des représentants des genres *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Sarcina* et des levures telles que *Candida* (Prescott *et al.*, 2003).

2.2. Intestin grêle

Après le passage de l'estomac à pH acide, le pH redevient neutre, l'oxygène se raréfie et la flore bactérienne qui a survécu au passage gastrique va augmenter progressivement du duodénum à l'iléon. La flore du duodénum-jéjunum n'excède pas 10^4 à 10^6 UFC/g de contenu intestinal et est composée d'espèces aéro-anaérobie facultatives (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*) appartenant à la flore de passage. La flore iléale est plus importante, atteignant 10^5 à 10^7 UFC/g du contenu intestinal avec une flore anaérobie stricte prédominante appartenant au genre *Bacteroides* associée à une flore anaérobie facultative (Rambaud *et al.*, 2004).

2.3. Côlon

Le colon est le segment le plus riche en bactéries. Les taux atteignent 10^9 à 10^{11} UFC/g du contenu. Dans le colon le transit, très fortement ralenti et associé à un très bas potentiel d'oxydoréduction, est à l'origine de l'augmentation importante de la population bactérienne anaérobie. Le colon, où la compétition pour l'espace et les nutriments contribue à maintenir l'intégralité de la microflore, est la seule zone colonisée de façon permanente par une flore résidente (Rambaud *et al.*, 2004).

3. Facteurs contrôlant la microflore intestinale

La composition et les fonctions de la microflore du tractus gastrointestinal sont influencées par divers facteurs liés au changement des conditions physiologiques de l'hôte (âge, état de santé...), de la composition du régime alimentaire et des circonstances environnementales (antibiothérapies, chimiothérapie, climat, stress, hygiène...) (Hopkins *et al.*, 2002).

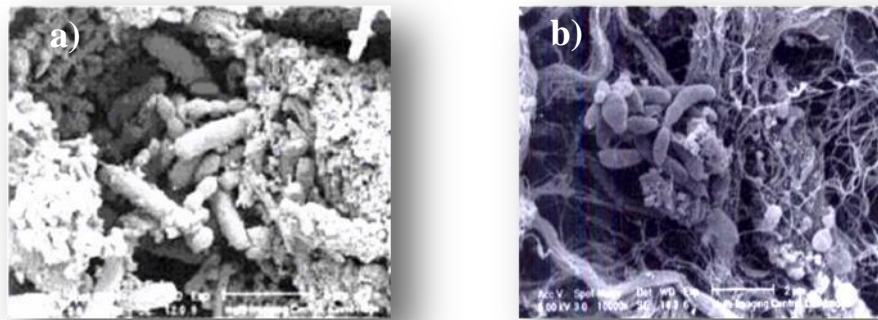


Figure 11. Microbes attachés dans le colon
a) à la muqueuse intestinale, b) à des particules alimentaires (Wilson, 2005).

3.1. Le pH

La sécrétion d'acide gastrique, constitue un facteur de défense majeur contre la colonisation du tube digestif par des pathogènes. Le risque d'infections intestinales est modérément mais significativement, augmenté en cas d'achlorhydrie (Rambaud *et al.*, 2004). Les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veilonellae* et *Micrococcus* poussaient avec succès aux pH inférieurs à 5 (Hill et Marsh, 1990).

3.2. L'oxygène

Nombreuses espèces bactériennes nécessitent un minimum d'oxygène, mais de tels organismes sont capables de proliférer si un accepteur d'hydrogène alternatif est disponible. Ainsi *Pseudomonas spp.*, *Micrococcus spp.*, *Neisseria spp.*, sont toutes capables de pousser dans des conditions anaérobies en présence de nitrate ou nitrite. À la différence des organismes aérobies stricts, les genres anaérobies stricts, sont incapables de survivre pour de longues périodes d'expositions même à des faibles concentrations en oxygène (Hill et Marsh, 1990).

3.3. L'âge

L'estomac secrète très peu d'acidité à la naissance et n'atteint l'optimum de sécrétion d'acides qu'au 15 ou 20 premiers jours, durant lesquels elle ne constitue pas une barrière bactéricide, ainsi les microorganismes passant colonisent la totalité du tractus digestif. Chez les personnes âgées la muqueuse gastrique devient progressivement moins active dans la sécrétion des acides, jusqu'à être incapable de maintenir un pH inférieur à 4 où le suc gastrique perdra son activité bactéricides et une microflore résidente s'établie dans la lumière gastrique (Hill et Marsh, 1990).

3.4. L'alimentation

L'effet de l'alimentation sur la microflore est dû à la fois aux bactéries présentes dans l'aliment (oraux ou exogènes), et à l'effet de l'aliment sur la microflore résidente à différents sites. Dans un environnement tel que le colon, où l'espace et la nourriture sont limités, les bactéries capables d'assimiler les nutriments aux plus rapides cadences, sous les conditions en vigueur apparaîtront en plus grand nombre. Les bactéries capables de digérer les nutriments non utilisés par les autres bactéries auront aussi un avantage écologique (Hill et Marsh, 1990).

3.5. La motricité intestinale

La fonction du mouvement péristaltique dans l'œsophage est d'accélérer le déplacement du bol alimentaire de la bouche vers l'estomac, par contre le péristaltisme dans le petit intestin tend à le ralentir. Ces mouvements associés à la sécrétion de fluides maintiennent ces deux compartiments relativement nettoyés. Quand une stagnation apparaît à n'importe quel site du tractus digestif, une microflore bactérienne résidente s'établit. Cette motricité peut être affectée par des maladies ou par des médicaments accélérant le transit ou le ralentissant (Rambaud *et al.*, 2004).

3.6. Interactions hôtes – Microbes

L'adhésion des microorganismes aux surfaces est essentielle. Des recherches récentes suggèrent que les cellules épithéliales de l'hôte peuvent exprimer des glycoconjugués spécifiques en réponse à la microflore intestinale indigène. (Lei et Walker, 2001).

La bile est un puissant agent sélectif, puisqu'elle élimine la majorité des espèces bactériennes à des concentrations relativement faibles, quelques espèces y sont résistantes. Le suc pancréatique qui est riche en enzymes protéolytiques, lipolytiques, et saccharolytiques est aussi un puissant agent antimicrobien exerçant une action sélective sur la microflore (Hill et Marsh, 1990).

3.7. Interactions Microbe-Microbe

a) Interactions négatives

Un exemple classique est la réduction de la dose infectante de *Salmonella* (10^3 organismes) jusqu'à moins de 10, quand la microflore normale intestinale est exposée à des antibiotiques. Un organisme occupant une niche écologique et produisant des

bactériocines serait ainsi capable de protéger son environnement local de la colonisation (Hill et Marsh, 1990).

b) Interactions positives

La réduction du contenu en oxygène et du potentiel redox par les bactéries aérobies et les anaérobies facultatives, permet la survie des espèces micro-aérophiles et anaérobies strictes. Certaines espèces ne sécrétant pas d'hydrolases sont incapables de digérer les macromolécules et sont donc dépendantes à d'autres organismes, pouvant les dégrader en molécules plus simples. Les taux d'enzymes impliquées dans la dégradation des composants insolubles des parois végétales sont élevés pour les organismes fixés sur les particules alimentaires. Finalement, plusieurs résidents du tractus digestif produisent des métabolites finaux pouvant être dégradés par d'autres organismes (lactate, acétate) (Wilson *et al.*, 2005).

Le quorum sensing est une modalité de communication intercellulaire, qui regroupe un ensemble de signaux complexes permettant aux bactéries de communiquer grâce à l'échange de molécules chimiques (Taga et Bassler, 2003).

4. Mise en place du microbiote intestinale

Lorsque la naissance se passe de façon naturelle, le profil de colonisation bactérienne intestinale du nouveau-né est assez stéréotypé. On peut le diviser en 4 phases durant la première année chez l'enfant allaité. Au-delà, le profil bactérien de la flore intestinale se rapproche de celui de l'adulte avec 10^{10-11} UFC/g de contenu colique (Langhendries, 2006).

5.1. Phase 1

La colonisation du tube digestif débute dès la rupture des membranes fœtales et se poursuit pendant plusieurs mois. À la naissance, le nouveau-né se colonise principalement à partir des flores maternelles fécale et vaginale, L'écologie bactérienne de l'environnement immédiat du lieu de la naissance est également importante, avec une flore assez rudimentaire qui atteint cependant en une semaine un niveau quantitatif de l'ordre de 10^{10} à 10^{11} unités formant colonie (UFC) par gramme de selles (Goulet, 2009).

5.2. Phase 2

Dans les jours qui suivent, la concentration des germes anaérobies stricts augmente. Par ailleurs, le profil bactérien se diversifie avec augmentation en nombre d'entérobactéries. Cette deuxième phase est clairement influencée par l'alimentation (Langhendries, 2006).

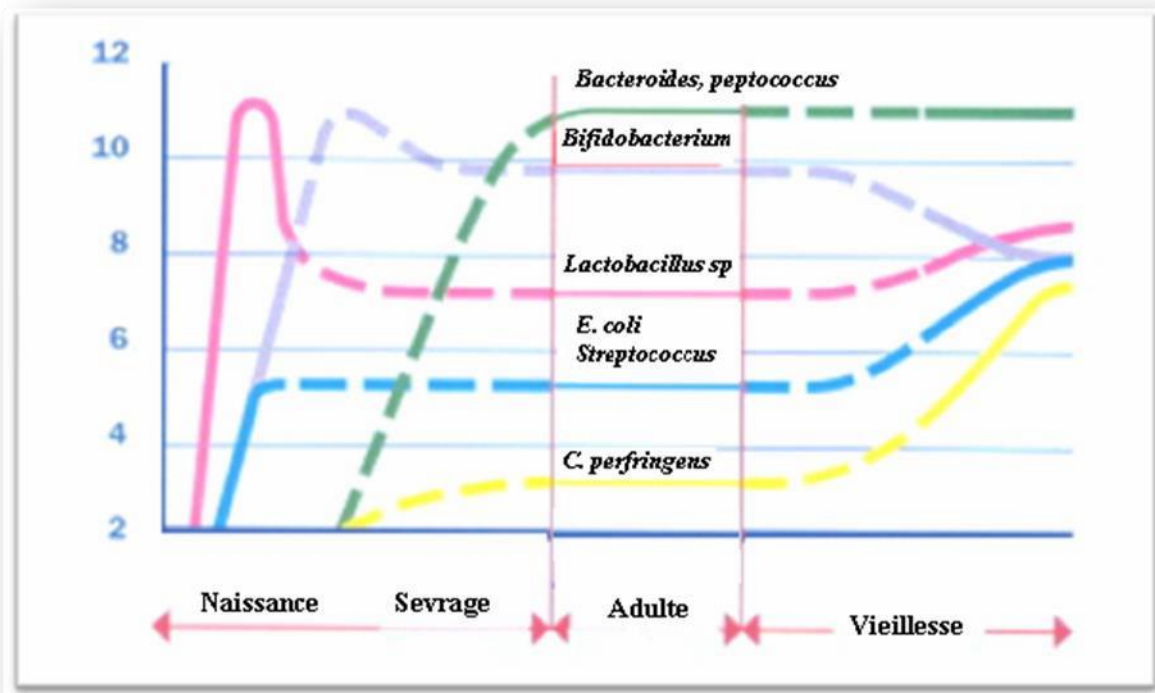


Figure 12. Évolution de la flore bactérienne fécale au cours de la vie (Goulet, 2009).

5.3. Phase 3

La troisième phase démarre avec le début de la diversification alimentaire. La flore anaérobie stricte plus diversifiée augmente également durant cette phase, au profit de variétés microbiennes très spécifiques du côlon tel que *Fusobacterium*, *Eubacterium* (Langhendries, 2006).

5.4. Phase 4

À la fin de la première année, la composition de la flore intestinale se rapproche de celle de l'adulte. Cette quatrième phase est marquée par la très grande augmentation de la flore anaérobie stricte dans la partie distale du côlon. Des différences peuvent persister entre enfant et adulte (Langhendries, 2006).

5. Facteurs influençant l'installation du microbiote intestinale chez le nouveau-né

De nombreux facteurs exogènes sont connus pour modifier cette cinétique d'implantation, parmi lesquels le mode d'accouchement, l'âge gestationnel de naissance, le type d'alimentation, l'environnement, ainsi que l'antibiothérapie administrée à la mère en *per-partum* et/ou à l'enfant après la naissance (Rambaud *et al.*, 2004).

6.1. Le type d'alimentation du nouveau-né

Dès le dixième jour de vie, le mode d'alimentation a un impact significatif sur le type de bactéries présentes dans l'intestin. L'alimentation au sein exclusive dès le premier jour, favorise une flore abondante composée essentiellement, pour ce qui concerne la flore anaérobie stricte, de *Bifidobacterium* et de bactéries acidolactiques (Langhendries, 2006).

6.2. Influence du mode d'accouchement

En effet, lors de l'accouchement par voie naturelle, le nouveau-né est colonisé immédiatement par le microbiote vaginal et intestinal de la mère. Puis, lors des heures et jours qui suivent la naissance, l'intestin acquiert un microbiote composé de bactéries issues de l'environnement, telles que celles issues de l'hôpital, de la famille, puis de l'habitat (Burcelin *et al.*, 2010).

Les enfants nés par césarienne rencontrent majoritairement en premier lieu les bactéries de leur environnement : air et personnel soignant. L'implantation de leur flore est donc différente de celle des nouveau-nés nés par voie basse. Les premières bactéries implantées sont toujours les anaérobies facultatifs (entérobactéries, entérocoques, staphylocoques), mais la flore anaérobie stricte s'implante beaucoup plus tardivement, ce retard portant principalement sur les genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides*, bactéries d'origine entérique (Campeotto *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la flore recto-vaginale maternelle étant le déterminant essentiel de la qualité de la flore bactérienne colonisatrice du nouveau-né, il est important de préserver sa diversité en évitant de donner à la mère dans la période périnatale des antibiotiques à large spectre, qui la modifient significativement. L'influence du mode d'accouchement sur la colonisation bactérienne du nouveau-né doit interpeller les obstétriciens et les pédiatres. (Tiihonen *et al.*, 2010).

6.3. L'influence de l'environnement

L'environnement et l'écologie bactérienne du lieu de naissance joue un rôle important dans la colonisation intestinale. Certaines études ont mis en évidence la colonisation à plus haut niveau et plus fréquente chez les enfants nés dans les pays en voie de développement par les bifidobactéries. Ces différences de flore sont vraisemblablement liées aux conditions plus strictes d'hygiène entourant les accouchements dans les pays industrialisés, réduisant l'exposition de l'enfant aux flores fécale et vaginale de sa mère (Campeotto *et al.*, 2007). Les mesures d'hygiène hospitalière susceptibles de diminuer l'essaimage des bactéries pathogènes doivent être respectées, le lavage des mains et leur alcoolisation répétée étant les mesures les plus efficaces (Langhendries, 2006).

6.4. Influence du terme de naissance

Peu d'études portent sur l'implantation de la flore intestinale du prématuré. Les faits notables de l'implantation de la microflore digestive chez ces nouveau-nés sont d'une part un retard de colonisation important, par rapport aux enfants nés à terme et d'autre part une colonisation par un nombre plus réduit d'espèces bactériennes. Si la flore aérobie (entérobactéries, entérocoques, staphylocoques) colonise assez rapidement le prématuré, l'implantation de la flore anaérobie tel les *Bifidobacterium* et *Bacteroides* est retardée. Ce retard d'implantation peut s'expliquer par le fait que ces enfants sont plus fréquemment nés par césarienne, sont rapidement séparés de leur mère et placés dans un environnement de soins intensifs très aseptisé et fréquemment soumis à une antibiothérapie à large spectre. En outre, chez ces prématurés hospitalisés plusieurs semaines la diversité de la flore d'un enfant à un autre décroît au cours de leur hospitalisation (Campeotto *et al.*, 2007).

L'étude de la flore des enfants nés prématurément en milieu hospitalier confirme que la colonisation bactérienne néonatale peut-être aussi influencée par les soins périnataux. Les traitements antibiotiques ou les soins en couveuse ont été corrélés à une colonisation insuffisante en *Bifidobacterium* et en *Lactobacillus*, ainsi qu'à une colonisation plus importante avec des germes pathogènes anaérobies, notamment *Clostridium* qui est associé à une morbidité néonatale accrue. Par ailleurs, ces modes de traitement augmentent le risque de colonisation par des germes pathogènes anaérobies facultatifs, parfois multirésistants aux antibiotiques (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) (Langhendries, 2006).

6.5. Influence de l'antibiothérapie

Les effets de l'antibiothérapie vont être, soit une sélection de germes résistants à l'antibiotique, soit une modification de la flore de barrière. L'antibiothérapie conduit à une redistribution de la population bactérienne de l'écosystème, à la pullulation de microorganismes insensibles au traitement et à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. Il est à noter les effets délétères de la réduction de la flore anaérobie dans les suites d'une antibiothérapie, par l'altération de la fonction de protection contre la colonisation. La diarrhée au décours d'une antibiothérapie classiquement observée est la conséquence d'une réduction du métabolisme des hydrates de carbone et des sels biliaires par les bactéries anaérobies (Abély, 2010).

6. Intérêt et rôle du microbiote intestinal

La flore intestinale, véritable organe microbien, assure de multiples fonctions primordiales : des fonctions métaboliques telles que la fermentation des résidus non digestibles, des constituants endogènes de l'hôte avec production d'acides gras à chaînes courtes ; source d'énergie, de vitamines, de fonctions trophiques sur la muqueuse intestinale, développement de l'angiogenèse intestinale, développement du système immunitaire local, motricité digestive, maintien de l'homéostasie pondérale et glucidique (Abély, 2010).

7.1. Effet barrière de la flore intestinale

Le premier rôle de la microflore intestinale normale est d'occuper une niche écologique, que pourrait envahir des entéropathogènes. De nombreuses souches intestinales sont antagonistes de bactéries pathogènes. En effet, la stabilité de la flore intestinale acquise en fin de la première année, est associée à une résistance à la colonisation par toute nouvelle bactérie exogène. Cette résistance dite « effet barrière », est en réalité un moyen de défense naturel de la muqueuse intestinale (Langhendries, 2006).

L'équilibre de la flore intestinale résulte d'interactions microbiennes au sein du microbiote intestinal, sous la forme de compétitions pour les substrats nutritifs ou les sites d'adhérence, et de modifications de l'environnement intestinal par des produits du métabolisme bactérien : pH, bactériocines, acides organiques (Goulet, 2009).

Au niveau du côlon, la flore commensale apporte plusieurs facteurs contribuant à la prévention de la colonisation par des microorganismes non commensaux : les acides gras volatils produits par les bactéries anaérobies sont délétères pour d'autres espèces bactériennes, dont les entérobactéries ; la production de bactériocines par les entérobactéries ; les streptocoques et les bactéries anaérobies limite la pullulation microbienne (Abély, 2010).

Ainsi la flore intestinale participe à réguler le transit intestinal, à empêcher la pénétration d'antigènes hostiles et à éviter la pullulation de germes pathogènes. Les mécanismes évoqués pour l'inhibition de la flore pathogène sont multiples et souvent concomitants:

- Production de substances inhibitrices tels que les acides organiques, notamment d'acide lactique, de bactériostatines, de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ;
- Occupation des sites d'adhésion sur la muqueuse intestinale ou sur le mucus qui la tapisse, contrecarrant ainsi la possibilité pour d'autres microorganismes de s'y fixer ;
- Dégradation de sites récepteurs de toxines ;
- Stimulation des fonctions immunitaires telles que la production d'IgA ;
- Compétition vis à vis des nutriments (Tiihonen *et al.*, 2010)

7.2. Effet métabolique

L'activité métabolique de la flore intestinale joue un rôle fondamental. Par la transformation des antigènes alimentaires, elle contribue à rendre les aliments plus tolérables par la muqueuse. Cette activité est intense et très diverse allant de la dégradation des polysides à la fermentation des sucres complexes, de la protéolyse à la putréfaction, de la fermentation, entre autre celle des acides aminés, à l'élimination d'hydrogène, métabolisme des acides biliaires, production de mutagènes et de vitamines et surtout l'augmentation de l'efficacité alimentaire en fermentant les aliments indigestibles, telles que les fibres alimentaires. L'intensité de cette activité est variable en fonction du type et du nombre de bactéries et de leur localisation. Elle est nettement moins diversifiée chez le jeune enfant, se limitant notamment à la production d'acides lactique et acétique chez le nourrisson exclusivement alimenté au sein (Burcelin *et al.*, 2010).

Chez l'adulte, la qualité de l'activité métabolique dépend de la nature des résidus alimentaires qui atteignent le côlon. La diversité des substrats dégradés et métabolisés par la flore, rend compte de la diversité des espèces bactériennes, de leur localisation et de celle des

métabolites qu'elles produisent (Leverve *et al.*, 2001). La production de CO₂ et d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) résultant de ce métabolisme est très importante. En effet, une partie contribue à l'apport énergétique de l'entérocyte et de l'organisme après absorption (Burcelin *et al.*, 2009).

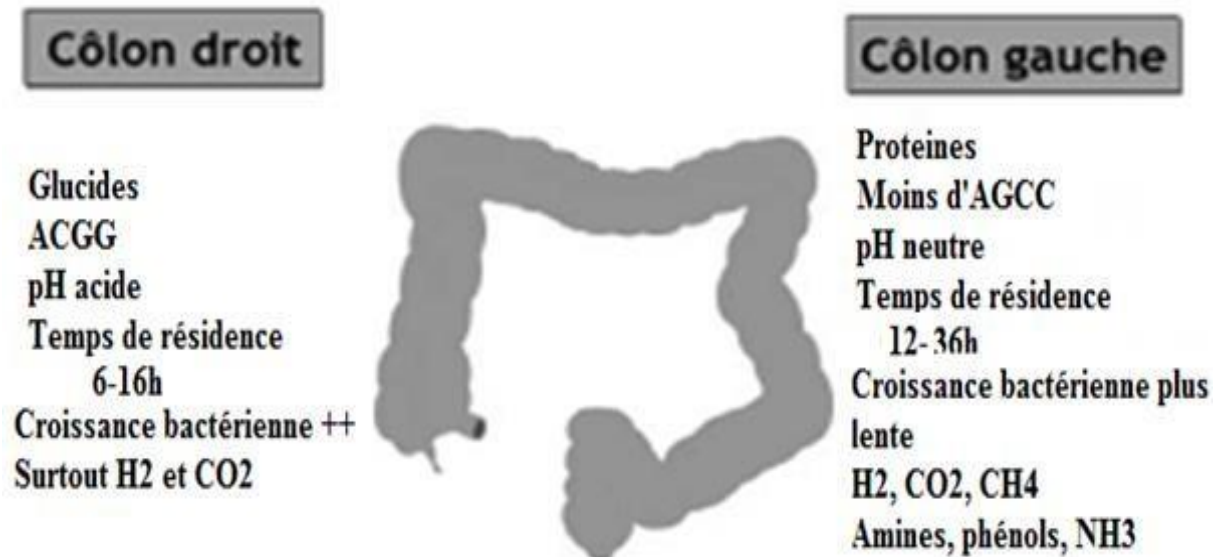


Figure 13. Différences métaboliques entre colon ascendant et colon descendant (Leverve *et al.*, 2001).

Ces métabolites exercent des effets nutritionnels, métaboliques et trophiques, contribuant ainsi au maintien en bonne santé de l'hôte. Leur perturbation peut entraîner des désordres importants allant de simples troubles du transit intestinal à des pathologies inflammatoires, voire cancéreuses (Goulet, 2009).

7.3. Rôle de la flore intestinale dans la mise en place du système immunitaire intestinal

Le microbiote intestinal orchestre la mise en place des défenses immunitaires, lors des premiers jours suivant la naissance ; ce qui permet un maintien de l'homéostasie intestinale et de l'intégrité immunitaire de l'hôte (Burcelin *et al.*, 2010).

Il existe un lien formel entre la flore bactérienne, la muqueuse intestinale et le système immunitaire, notamment par l'intermédiaire du système immunitaire inné, dont les toll-like receptors (TLR) sont les principaux acteurs. La muqueuse intestinale, avec une surface de plus de 300 m², est en permanence exposée à une quantité très importante d'antigènes, qu'ils soient d'origine alimentaire ou bactérienne. La flore bactérienne intestinale joue des rôles essentiels au niveau des systèmes immunitaires intestinal (Goulet, 2009).

La microflore intestinale semble influencer le nombre et la répartition des cellules du GALT (tissu lymphoïde associé du tractus gastro-intestinal), qui représente environ les 2/3 du système immunitaire de l'organisme, et de ce fait joue un rôle dans la maturation du système immunitaire du nourrisson. La flore joue donc un rôle de régulation du système immunitaire. Celui-ci est immature et caractérisé par une réponse déséquilibrée des lymphocytes T helper 2 (Th2) supérieure à celle des Th1 de même qu'une insuffisance de T régulateurs. La colonisation bactérienne progressive du tube digestif est, à cet égard, essentielle pour établir un équilibre entre les Th2 et les autres types de lymphocytes (Th1 et Th3). La flore intestinale joue donc un rôle dans l'acquisition de tolérance et par conséquent dans la prévention de l'allergie. Parallèlement à la colonisation bactérienne de surface, on observe une augmentation des immunoglobulines rapidement après la naissance; IgA surtout, IgG et IgM transitoirement, ainsi qu'une élévation des lymphocytes T au niveau de la muqueuse intestinale (Goulet, 2009).

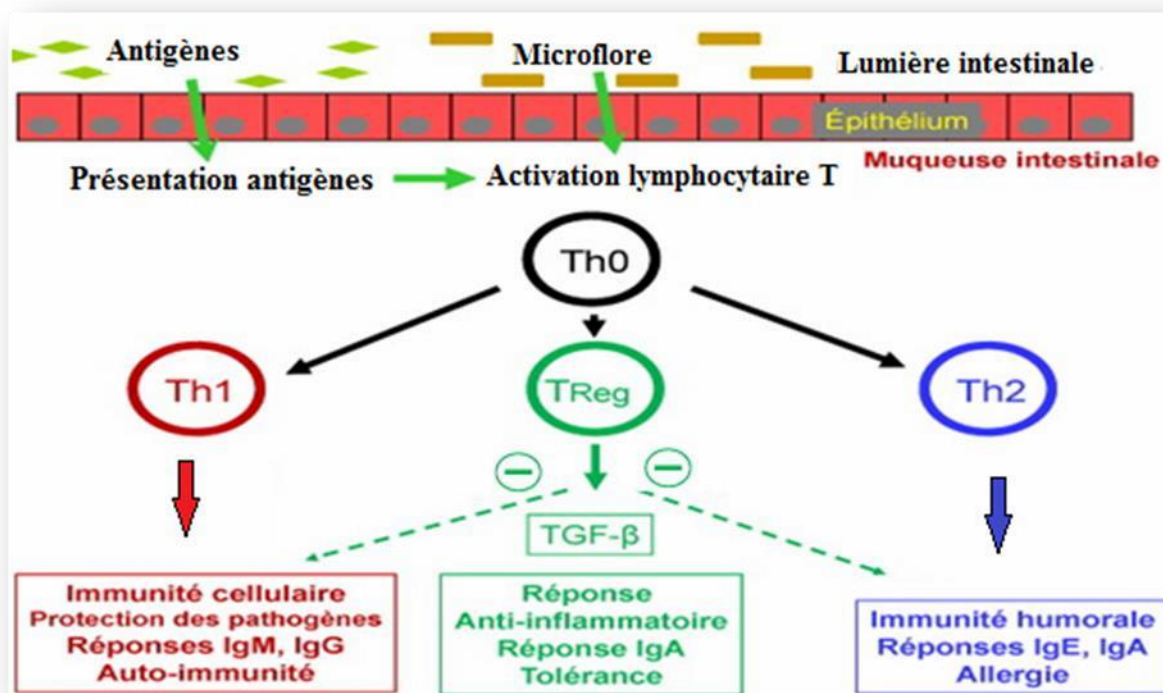


Figure 14. Interactions microflore et système immunitaire et orientations de la réponse immune (Goulet, 2009).

On distingue deux parties distinctes du système immunitaire ; la première, la voie adaptative, déclenche une réponse spécifique pour un antigène qui nécessite une concertation

parfaite entre cellules présentant un antigène, puis différents lymphocytes T et B, permettant de déclencher une réponse cellulaire ou humorale. La colonisation par une flore commensale met en place et sensibilise le système immunitaire adaptatif et spécifique, pour le rendre opérationnel en vue d'une lutte contre des bactéries potentiellement pathogènes. Le rôle de la flore intestinale est plus large que l'immuno-stimulation. Les bactéries de la flore rentrent en compétition avec les pathogènes pour les nutriments, ainsi que pour des récepteurs sur les cellules intestinales ; évitant une invasion importante de pathogènes. L'hypothèse d'une production de colicines bactéricides par la microflore toxique pour les pathogènes a aussi été avancée (Ruemmele, 2007).

La seconde voie, celle du système immunitaire inné, au champ d'application plus large, reconnaît directement les bactéries, mais aussi des virus et champignons à partir de motifs microbiens conservés. Chaque fois qu'un pathogène approche, il est immédiatement reconnu, permettant une réponse appropriée en quelques secondes ou minutes. Ce système fonctionne sans présentation d'antigène, via des récepteurs spécifiques (pathogen recognition receptors- PRR), qui sont exprimés à la surface et dans le cytoplasme des cellules immunocompétentes du système immunitaire inné, et notamment de l'entérocyte (Ruemmele, 2007).

Une sélection supplémentaire provient de la production de défensines par l'organisme. Ces protéines sont sécrétées par les cellules de Paneth présentes dans les cryptes des villosités intestinales. Environ 5 à 15 cellules de Paneth sont localisées dans les bases cryptiques de chaque villosité. Ces défensines ont des propriétés antimicrobiennes. Les cellules productrices se développent très tôt après la naissance, ce qui confère d'emblée une résistance aux pathogènes opportunistes (Burcelin *et al.*, 2010).

7.4. Flore intestinale et insulino-résistance

Il existe une forte relation entre le type de flore intestinale et l'insulino-résistance. En effet, il s'est avéré qu'une alimentation riche en lipides favorise la prolifération d'une flore intestinale riche en bacilles Gram négatif dont on sait que les parois sont riches en lipopolysaccharides. Or, il s'avère que le LPS est considéré comme le plus fort inducteur de sécrétion de cytokines. En effet, le récepteur au LPS est le CD14, glycoprotéine membranaire qui contrôle la synthèse et la production de cytokines inflammatoires. Celles-ci, à leur tour, sont impliquées dans la genèse de l'insulino-résistance en induisant de multiples altérations de la voie de signalisation de l'insuline (Yazigi *et al.*, 2008).

L'excès lipidique, en modifiant la flore intestinale, augmente la disponibilité du LPS ce qui favorise la production de cytokines inflammatoires via le CD14 puis l'insulinorésistance, ces conditions nutritionnelles par le biais de la flore intestinale peuvent ainsi favoriser non seulement l'obésité, mais également des anomalies métaboliques graves comme l'insulinorésistance ; en revanche une alimentation riche en fibres fermentables connues pour favoriser la croissance de bactéries de type *Bifidobacterium* est capable de réduire le niveau d'endotoxine en modifiant les propriétés de la muqueuse intestinale, ce qui normalise les paramètres inflammatoires et les paramètres métaboliques altérés, insulinorésistance, et intolérance au glucose (Delzenne *et al.*, 2009).

7.5. Prévention du cancer colique

La viande peut être convertie en amines hétérocycliques durant sa cuisson, la fermentation bactérienne des protéines, idem, produits des amines et de l'ammoniaque fortement toxigéniques. Deux enzymes capables de produire des carcinogènes sont la β -glucoronidase chez l'hôte et la β -glucosidase chez la microflore, bien que cette dernière catalyse d'autre part la production de substances antimutagènes.

Les bactéries lactiques sont capables de réduire les taux de ces deux enzymes dans les fèces. Cela peut-être dû à l'inhibition de l'enzyme ornithine décarboxylase, ou par le blocage du gène promoteur de la tumeur (ras-21). De plus la stimulation du système immunitaire devrait être un autre mécanisme anticancéreux de certaines bactéries de la flore intestinale (Vernazza *et al.*, 2006).

7.6. Réduction du cholestérol

Des recherches *in vitro* et *in vivo* ont révélées que certaines bactéries de la flore intestinale, peuvent faire baisser le niveau du cholestérol sérique, quatre mécanismes sont suggérés : la production de propionate, l'assimilation du cholestérol par les bactéries, la fixation du cholestérol aux parois bactériennes et la dégradation enzymatique (Burcelin *et al.*, 2009).

7.7. Autres bénéfices sanitaires

Dans le cas de mal digestion du lactose (déficience en β - galactosidase), les produits du lait fermenté sont mieux tolérés que le lait, grâce à la présence de bactéries lactiques qui possèdent cette enzyme. La lyse des bactéries dans le tractus gastro-intestinal libère cette enzyme permettant une meilleure digestion du lactose. Mécanisme également remarqué pour la digestion du sucrose chez les enfants déficients en sucrase où *Saccharomyces cerevisiae* a montré une action similaire (Vernazza *et al.*, 2006).

7. Facteurs d'agression de la flore intestinale

Un certain nombre de facteurs thérapeutiques ou diététiques altèrent durablement la flore intestinale (Goulet, 2009).

7.1. L'antibiothérapie

Chez le nourrisson et l'enfant, l'emploi d'une antibiothérapie est fréquent et peut entraîner une modification de cet écosystème au niveau de l'intestin et du côlon, en particulier aux phases cruciales d'implantation et de développement d'une flore bifide dominante ; et altérer les fonctions bénéfiques du microbiote (Goulet, 2009).

L'antibiothérapie conduit à une redistribution de la population bactérienne, à la pullulation de microorganismes insensibles au traitement et à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. Il est à noter les effets délétères de la réduction de la flore anaérobie suite à une antibiothérapie :

- Par modification de la flore intestinale, l'antibiothérapie peut altérer la fonction de protection contre la colonisation.
- La diarrhée au décours d'une antibiothérapie classiquement observée est la conséquence d'une réduction du métabolisme des hydrates de carbone et des sels biliaries par les bactéries anaérobies ;
- La survenue d'infection fongique au décours d'une antibiothérapie. La pullulation fongique est tout particulièrement observée lorsque l'antibiothérapie réduit la flore commensale anaérobie
- L'acquisition de résistance vis-à-vis diverses classes d'antibiotique (Abély, 2010).

7.2. L'utilisation des traitements antiacide

Elle altère également la flore notamment dans le cadre du reflux gastro-œsophagien. L'absence de prokinétiques (médicaments accélérant la digestion) efficaces a conduit à une augmentation majeure de la prescription d'inhibiteurs de la pompe à protons. L'alcalinisation gastrique supprime l'une des

principales barrières à la colonisation par des bactéries de l'environnement, éventuellement pathogènes. Il a été montré que les traitements antiacides augmentent le risque de diarrhée infectieuse et de pneumonie (Goulet, 2009).

7.3. Carence en fibres alimentaires

Une alimentation ne comprenant pas ou si peu de fibres alimentaires ne favorise pas l'implantation et surtout le maintien d'une flore équilibrée avec une proportion suffisante de bifides (Goulet, 2009).

7.4. Gastroentérite aiguë

Une banale gastroentérite aiguë (GEA) virale ou, plus rarement, d'origine bactérienne altère la flore intestinale. La plupart des enfants des pays à haut niveau de vie guérissent rapidement. Cependant, certains développent le classique tableau de diarrhée grave prolongée post-infectieuse, dont un déséquilibre durable de la flore intestinale avec toutes les conséquences que ses nombreux rôles physiologiques laissent supposer (Goulet, 2009).

Il ne faut sous-estimer aucun de ces facteurs. En raison du rôle de la flore intestinale dans le développement des fonctions immunitaires et dans l'acquisition de tolérance, des modifications durables de celle-ci, notamment en raison d'antibiothérapies répétées, ont forcément un impact même s'il est difficile de le mesurer avec précision (Dessein *et al.*, 2009).

A photograph of pomegranates and seeds. On the left is a whole, ripe pomegranate with a reddish-pink hue. To its right is a pomegranate cut open, revealing the bright red, jewel-like seeds inside. Several individual seeds are scattered on the white surface in front of the open fruit. The background is plain white.

Partie expérimentale
I Matériel et Méthodes

I. Matériel et Méthodes

➤ Objectif du travail

Devant le problème posé par l'apparition de microorganismes résistants, la recherche de nouvelles substances actives antimicrobiennes d'origine naturelles, plus efficaces et moins toxiques s'imposent. Partant de ce principe, nous avons choisi d'étudier les extraits phénoliques obtenus à partir de l'épicerpe de *Punica granatum* issus de la région de Mascara comme une source de ces substances antimicrobiennes.

Notre travail s'articule sur

- Préparer les différents extraits phénoliques à partir de l'épicerpe de *Punica granatum*
- Caractériser dans les extraits phénoliques les principaux groupes et composants chimiques et le dosage phytochimique de différents extraits
- Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques sur les souches bactériennes .
- Evaluation de la toxicité aigüe des extraits de végétaux étudiés *in vivo*
- Évaluation *in vivo* de l'activité antimicrobienne de l'extraits méthanoliques de *Punica granatum* sur la flore gastrique.

I.1. Matériel végétal

Le choix de la plante utilisée dans ce travail était basé non seulement sur une enquête pharmaco-traditionnelle auprès d'une population ayant connaissance de leur usage traditionnelle mais aussi sur un choix spécifique de valorisation des plantes tel que le grenadier, qui n'ont pas été étudiée à ce jour, pour essayer de contribuer à l'évaluation de d'autres activités biologiques non élucidées auparavant sur ces plantes surtout *in vivo*.

Les fruits de grenadier (*Punica granatum*) sont récoltés à maturité le mois d'Octobre (2014), dans la région de Mascara. L'épicerpe de ces fruits est isolé, séché à l'air libre et à l'abri de la lumière, puis broyé à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine nécessaire à la préparation de différents extraits.



Figure 15 : Grenade ; Ecorce de grenade et poudre d'écorce séché

I.2. Extraction des polyphénols

I.2.1. Préparation des extraits phenoliques

10g de la poudre végétale de *punica granatum* sont mises à macération pendant 24 heures à température ambiante, dans un mélange solvant-eau (70:30 V/V) ou dans 100 ml eau distillée, le tout par la suite est filtré sur papier Whatman, l'extraction est refaite plusieurs fois avec renouvellement du solvant. Le solvant est éliminé du filtrat par évaporation rotative dans un rotavapor (BÜCHI). La série d'extraction permet d'obtenir trois extraits ; l'extrait aqueux, ethanolique et méthanolique. Les extraits sont séchés et conservés jusqu'à utilisation ultérieure

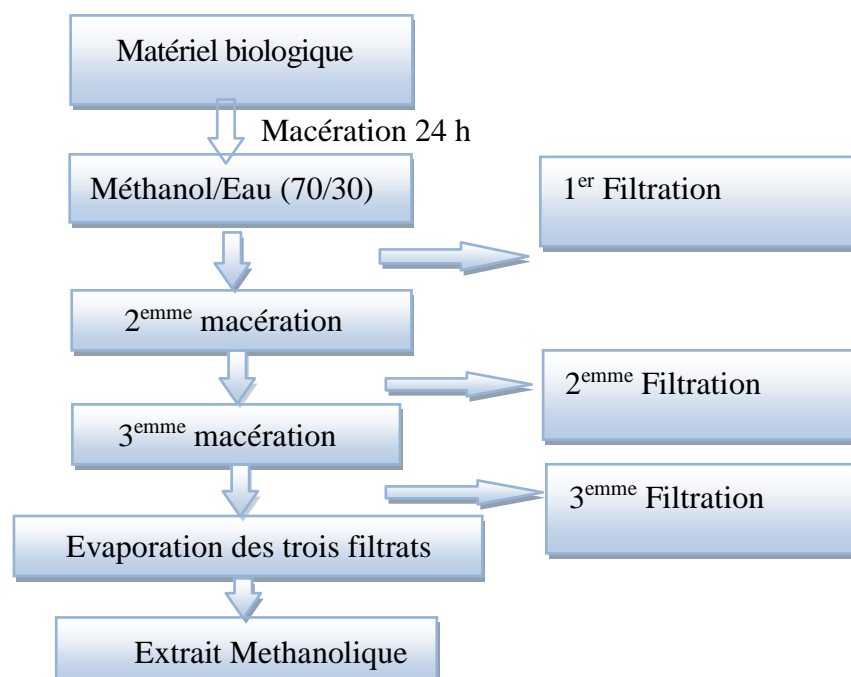


Figure16 : protocole expérimentale d'extraction.

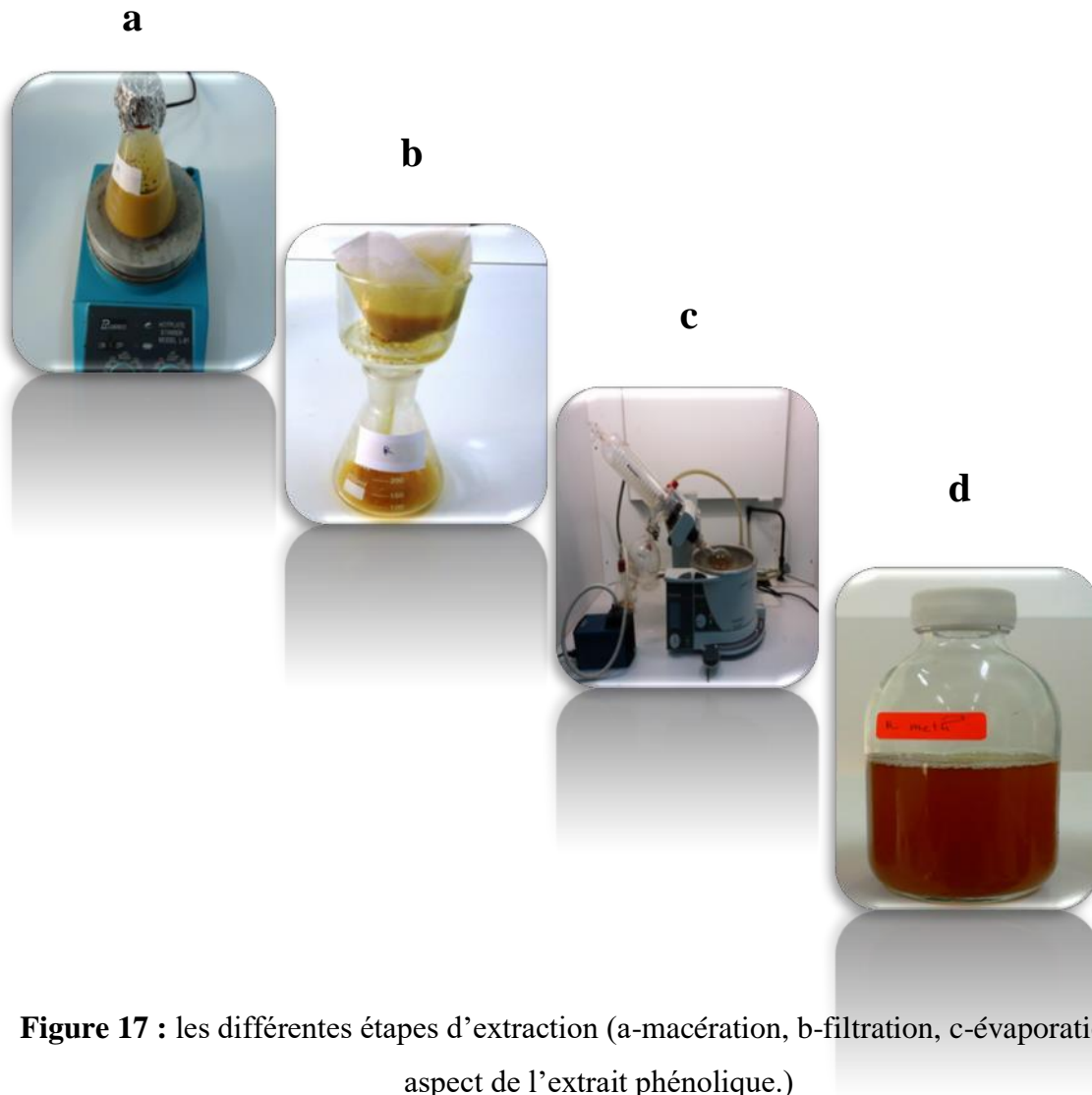


Figure 17 : les différentes étapes d'extraction (a-macération, b-filtration, c-évaporation, d- aspect de l'extrait phénolique.)

I.2.3. Rendement des extraits

Le calcul du rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenu et la masse de matière végétale à traiter (Belyagoubi, 2006) :

$$R = (m / m_0) \times 100$$

R : Rendement en extrait fixe en g/100g.

m : Quantité d'extrait récupéré en g.

m₀ : Quantité de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g.

I.3. Screening phytochimique

La méthode de détection des différentes familles de composés consiste en une précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques. En effet, ces réactions se traduisent par l'apparition d'une turbidité, floculation ou changement de couleur qui nous renseigne sur la nature des familles existantes dans la plantes.

❖ Les flavonoïdes

À 5 ml de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes d'HCl concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange. (Karumi et al, 2004).

❖ Les tanins

Un volume de 2 ml de chacun des deux extraits, est additionné à 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 1%. Après quelques minutes d'incubation, le chlorure ferrique développe une coloration verdâtre qui indique la présence des tanins catéchiques ou bleu-noirâtre qui révèle l'existence des tanins galliques. (Karumi et al, 2004).

❖ Les alcaloïdes

Pour chaque extrait on réalise la procédure suivante : on ajoute 5 ml d'HCL 1% à 1ml de chaque extrait, le tout est chauffé au bain marie, puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes. (Majob, 2003).

❖ Les quinones libres

Sur un volume de chacun de nos extraits, quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres. (Oloyede, 2005).

❖ Les terpénoïdes

À 5 ml de chaque extrait, on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml de H₂SO₄ concentrée. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur maron en interphase (Edeoga et al .,2005)

❖ **Les coumarines**

Une quantité de quelques milligrammes de chaque extrait est solubilisée dans 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente un témoin ;
- La deuxième est traitée avec 0.5 ml de NH₄OH à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines. (Benmehdi, 2000)

❖ **Les anthraquinones**

À 10 ml de chacun de nos extraits, on ajoute 5 ml de NH₄OH à 10% et on agite. L'apparition de couleur violette indique un test positif (Oloyede, 2005).

❖ **Les sucres réducteurs**

On ajoute 1 ml de liqueur de Fehling à 5 ml de chaque extrait. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité rouge brique.

I.4. Dosage phytochimique

1.4.1. Dosage des poly phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin - Ciocalteu selon la méthode citée par (Wong et *al.*, 2006).

- **Principe**

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (Wong et *al.*, 2006).

Brièvement 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 5 minutes à 25 °C.

Après l'incubation 800 μ l de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 7.5 % (p/v) a été ajoutée dans les tubes. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 760 nm.

- **Expression des résultats**

La concentration des poly phénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200 μ g/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg).

I.4.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par Dewanto *et al* (2002). Une quantité de 500 μ l de solution méthanolique de catéchine à différentes concentrations ou de l'extrait méthanolique dilués est ajoutée à 1500 μ l de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 μ l de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 μ l de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % (m/v) est rajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 μ l d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné.

Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des plantes médicinales est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g). Chaque échantillon est répété trois fois.

I.4.3. Dosage des flavones et flavonols

La méthode utilisée pour l'estimation de taux de flavonols est celle décrite par (Kostova , 2005).

Mode opératoire

Mettre 0.50 ml d'extrait dans un tube à essai ; ajouter 1.5 ml d'éthanol, 0.1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 % puis 0.1 ml d'acétate de sodium et 2.8 ml d'eau, laisser incuber 30 min à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 415 nm.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (2-14 µg/ml) et exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

I.4.4. Dosage des tannins condensés

La détermination de la teneur en tanins condensés a été effectuée en utilisant la méthode spectrophotométrique (Julkunen-Titto, 1985). Un volume de 0.5 ml d'extrait polyphénolique ou standard (catéchine) ajouté au mélange de 3 ml au mélange 4% vanilline et de méthanol (v/v), 1.5 ml d'acide chlorhydrique puis homogénéisé.

Le mélange résultant a été laissé au repos pendant 15 min à température ambiante, l'absorbance de chaque calculée à 500 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu UV-1800, Japon). La teneur totale en tanins condensés est calculée comme étant mg équivalent de catéchine (CTE mg/g) en utilisant l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage, les résultats présentés sous forme des moyennes (\pm SEM) et sont analysées avec trois expériences séparées.

I.5. Identification et quantification des composés phénoliques de l'extrait méthanolique par HPLC

Les analyses HPLC sont réalisées sur une chaîne HPLC de marque Agilent (HP 1100 Waldbronn, Allemagne) équipée d'un système de dégazage, d'une pompe quaternaire, d'un système d'injection automatique thermostaté et d'un détecteur à barrettes de diodes.

Les composés phénoliques sont séparés en appliquant un gradient d'élution sur une colonne en phase inverse Nucleodur® C18 Gravity (250 x 4,6 mm, ayant des particules de 5 µm et des pores de 110 Å) (Macherey Nagel, Allemagne), thermostatée à 30°C. Les solvants (A) et (B) correspondent respectivement aux solutions eau/acide formique 95/5 (v/v) et acétonitrile/eau/acide formique 80/15/5 (v/v/v). L'extrait méthanolique de *Punica granatum* est injecté (10 µL) et l'élution des composés phénoliques se fait pendant 90 min après application du gradient

Les chromatogrammes ont été enregistrés et leur traitement a été exploité en utilisant le logiciel ChemStation (Agilent, Allemagne). Les composés phénoliques sont identifiés à partir de leurs longueurs d'onde et de leurs temps de rétention.

L'identification des composés phénoliques est effectuée en comparant les pics trouvés à des étalons de références bien déterminés. Le pic de chaque molécule est intégré et sa surface est ainsi notée en tenant compte des solutions standard qui nous ont permis d'étalonner l'appareil HPLC. Les composés sélectionnés pour la calibration sont analysés à leur longueur d'onde d'absorption maximale.

I.6. Etude in vitro de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques

I.6. 1. Souches bactérienne utilisées

Les souches bactériennes sont fournies par laboratoire de microbiologie, faculté de science de la nature et de la vie, université de Mascara. Leur croissance est réalisée sur gélose nutritif. Ce sont des espèces Gram négatif /ou Gram positif, pathogènes et responsables d'infections graves chez l'homme et dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques. Elles sont revivifiées à 37 °C par repiquage sur Bouillon nutritif.

Tableau 05 : Les bactéries utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne *in vitro*

Genre et espèce	Gram
<i>E.coli</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Lactobacillus</i>	+
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	+
<i>Streptococcus intermedius</i>	+
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-
<i>Klebseila pneumoniae</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-

I.6.2. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (Burnichon et texier, 2003).

On a utilisé le milieu de Mueller-Hinton coulé dans une boîte de Pétri de façon uniforme et jusqu' à une épaisseur de 4 mm Les géloses sont séchées avant l'emploi. L'ensemencement de l'inoculum de 1 mL est inondé en surface du milieu Mueller Hinton, jeter l'excès après 05 min. Technique (OMS, 2002 ; IPA, 2008)

- **Application des disques d'antibiotiques**

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre. Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces stériles pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé. Incuber les boîtes pendant 18 heures à 37°C.

- **Lecture**

Mesurer avec précision, les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.

I.6.3. Activité antibactérienne par technique de diffusion en milieu solide

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée par (NCCLS) cité par (Celiktas *et al.*, 2007). NCCLS :(National committee for clinical laboratory standards)

I.6.3.1. Préparation des concentrations

Les extraits ont été repris avec l'eau distillée stérile. Des dilutions en série de 1/2 à 1/8 ont été ensuite réalisées pour obtenir des concentrations de 100 à 12.5mg/ ml.

I.6.3.2. Préparation de l'inoculum bactérien

A partir d'une culture de 18 h, une suspension bactérienne a été préparée de façon à obtenir une densité équivalente au standard de 0,5 Mac Farland. Cette densité correspond à une concentration de $10^6 - 10^8$ UFC/ml (Wade *et al.*, 2001).

I.6.3.3. Ensemencement

Dans les 15minutes suivant l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum (0.5 McFarland), on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière de la gélose (Gélose Mueller Hinton) à trois reprises , en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum . Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

I.6.3.4. Incubation

Les disques stériles imprégnés des concentrations croissantes d'extraits à raison de 10 µl par disque (Ngameni et *al.*, 2009), ont été déposés stérilement à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose. Les boîtes ont été incubées 24 h à 37 °C en atmosphère normale.

I.6.3.5. Expression des résultats

La lecture se fait par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse en mm (figure 14). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone vierge et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis les extraits phenolques. (Ponce et *al.*, 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 8 à 15mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 20 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

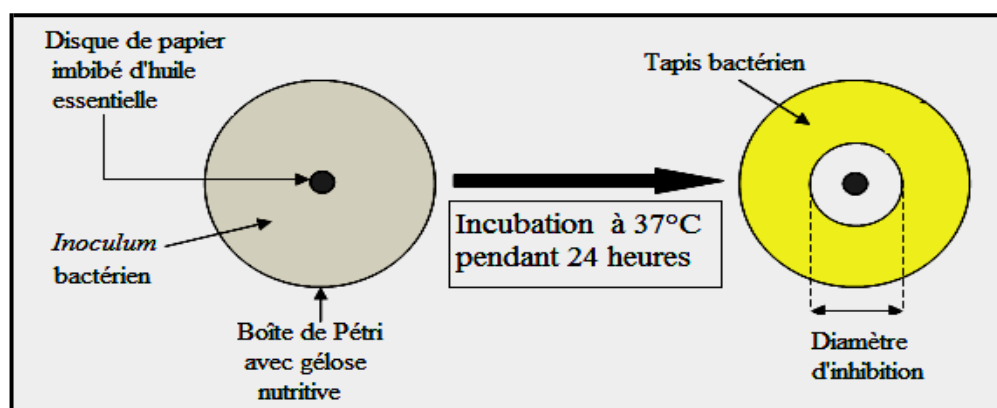


Figure 19 : Principe de la méthode de diffusion en milieu gélosé (Ponce et *al.*, 2003)

I.6.4. Etude la cinétique de croissance et la CMI par la microplaque

La méthode de dilution en milieu liquide permet de déterminer les paramètres (CMI, CMB) d'inhibition de la croissance bactérienne par les extraits ou les composés actifs. La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme étant la concentration minimale d'extrait (ou de composé) ne laissant pas de bactéries survivantes de l'*inoculum* après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures. (Dramane, 2010)

Les CMI sont déterminées par la méthode standardisée de micro-dilution en milieu liquide. L'étude est réalisée en microplaque en matière plastique comportant 96 puits (08 rangées et 12 puits numérotés de 01 à 12) en bouillon Muller Hinton. Avec un inoculum de densité finale situé en précédente, les microplaques sont incubées 18h à 24h. Les dilutions de l'échantillon ont été distribuées en cascade dans les cupules de la concentration la plus forte (10 mg/ml) à la plus faible (0.004 mg/ml), les dilutions des extraits sont réalisées dans le DMSO.

La CMI correspond à la première dilution où la croissance est négative (pas de culture visible) (DRAMANE *et al.*, 2010), la cinétique est évaluée par la mesure de la DO des microplaques à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (TECAN) à t_0 et après 4h, 8h, 16h et 24 heures. (Wade *et al.*, 2001 ; Radojevic *et al.*, 2012).

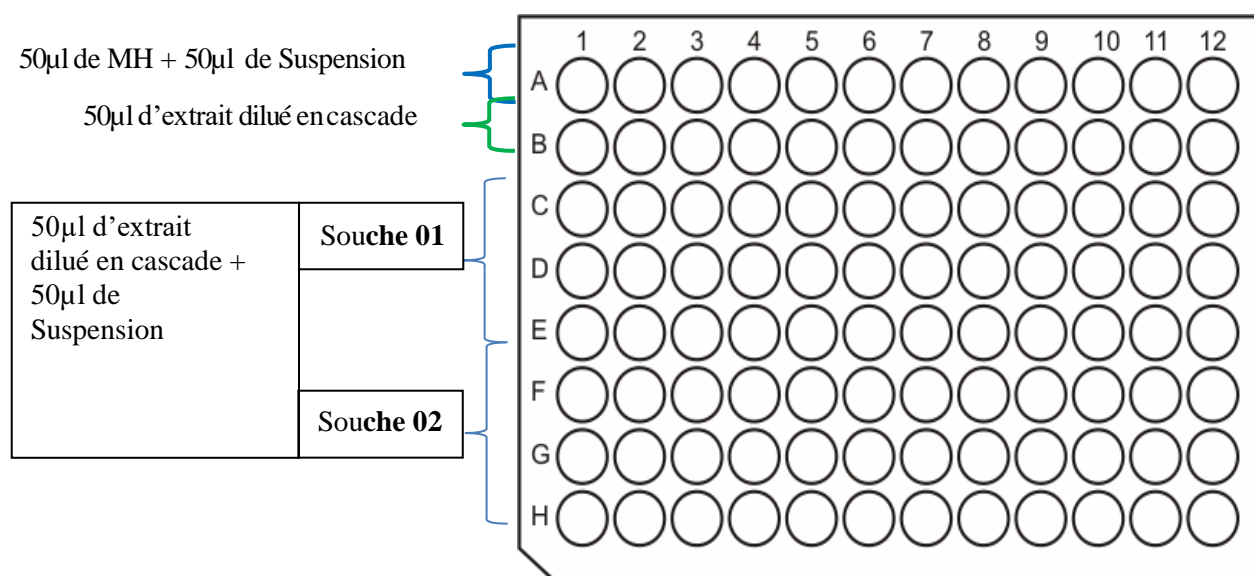


Figure 20 : Schéma d'utilisation de microplaque

I65. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Pour déterminer la CMB, le jour suivant lecture de la CMI, un ensemencement de 10µl de culture en stries de 5 cm chacune a été effectué à partir des cupules ne présentant pas de croissance visible à l'œil nu. Après 18h d'incubation à 37°C, le nombre de colonies a été déterminé. La CMB sera la plus faible concentration en extraits phénoliques où le pourcentage de bactéries survivantes est $\leq 0,01\%$ de l'inoculum initial (SFM, 2012).

I6.6. Le rapport CMB/CMI

Le rapport CMB/CMI a été calculé pour chaque extrait. Dans la mesure où ce rapport est supérieur à 32, la souche bactérienne présente donc une tolérance à l'agent antibactérien testé (Jacquiera *et al.*, 2007).

I.7. Etude *in vivo*

I7.1. Les animaux

Des rats de race *Wistar* de sexes opposés (un male et une femelle réunis dans la même cage) choisis de façon aléatoire qui font un sujet de choix dans notre étude.

Le choix et le type d'espèce pour l'étude a été opté sur le rat, car il existe une certaine similitude entre sa physiologie et celle de l'homme, mais aussi pour des raisons pratiques, le rat présente en outre d'autres avantages :

- ✓ Leur petite taille qui occasionne peu de contraintes liées à l'hébergement.
- ✓ Leur durée de vie réduite qui permet de faire des études sur plusieurs générations.
- ✓ Leur période de gestation réduite et la taille des portées, utile pour les études en reproduction.

I7.1.1. Accouplement

Après accouplements, les rats sont mis séparément dans des cages individuelles en plastique translucide avec une grille adaptée pour la nourriture et les biberons comme couvercle. Les biberons d'alimentation en eau, sont fait par une matière translucide de façon à pouvoir vérifier le niveau de remplissage, s'agissant de rongeurs les bouts d'extrémités sont en structure métallique dure, d'autre part ces cages sont remplies par le scieur dans le but de garder une température ambiante et être facilement nettoyable pour que l'entretien se déroule dans les meilleures conditions hygiéniques.

On place le couple dans la même cage pendant cinq jours, ensuite un nouveau male est introduit dans la cage pendant cinq jours, afin d'augmenter la chance d'accouplement



Figure 21 : Accouplement.

Les femelles gestantes sont ensuite séparées de leurs congénères en vue de les protéger contre tout stress jusqu'à la mise bas où la mère commence à préparer son nid.



Figure 22: femelle gestante

I7.1.2. Elevage

Les rats ont été placés dans un environnement protégé à l'abri des bruits. C'est une pièce à température ambiante du moment qu'elle fait partie des facteurs environnementaux critiques à maîtriser car ce paramètre possède un effet direct sur le métabolisme des animaux, une température trop élevée peut être l'origine de la mort de certains animaux, de stérilité suite à une trophie bilatérale des testicules, d'une augmentation de la mortalité embryonnaire, d'une diminution de la lactation d'une part, et le froid retarde la puberté et diminue la fertilité d'autre part.

La salle est éclairée 12 heures sur 24 heures car l'éclairage à une influence sur la reproduction, le comportement et la physiologie des mammifères ainsi que sur le poids des ovaires et de l'utérus, le temps d'ouverture du vagin, la longueur du cycle œstral.

En outre l'endroit est muni d'un système de ventilation qui a pour but d'amener de l'air pur dans le local d'hébergement, de réduire les odeurs, les gaz toxiques, la poussière, les agents infectieux potentiels, la chaleur et l'humidité excessive.

La salle et tout le matériel nécessaire ont été préalablement désinfectés.

Cette étude a été réalisée sur quarante (40) rats males, de type *Wistar* dont le poids varie de 150 à 180g et présentant une génération descendante d'une race qui n'est pas passée par un traitement médical. Les rats sont logés dans des cages avec accès libre de nourriture et d'eau et à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité.



Figure 23 : L'élevage des rats

Les principaux microorganismes incriminés dans la contamination des aliments sont les bactéries. La contamination des produits par les bactéries est un véritable fléau pour l'industrie agroalimentaire. En effet, *Bacillus cereus* peut être déjà la cause de plusieurs cas de toxi-infection alimentaire parmi les 60% des cas dont l'agent est inconnu (Ziane, 2015). Parmi les bactéries responsables, les 4 les plus incriminées sont les salmonelles, les staphylocoques, les *Clostridium* et les bactéries du groupe *Bacillus cereus* (Delmas *et al.*, 2010). L'implication des trois premières a été mise en évidence depuis de nombreuses années et dans le cas de toxi-infection alimentaire leur implication est systématiquement recherchée. En ce qui concerne les *Bacillus cereus* la preuve de leur implication dans les toxi-infections a été plus longue à être mise en évidence.

Vu sa pathogénicité et son implication dans deux pathologies distinctes de type émétique et diarrhéique d'une part, et Vu le problème d'antibiorésistance entamé précédemment qui risque de toucher l'efficacité de traitement de ce genre de pathologie par antibiothérapie, ce présent travail s'est focalisé dans la recherche de traitement alternatif naturel à base de plante *in vivo* via notre extrait méthanolique de *Punica granatum* déjà prouvé d'avoir un effet antimicrobienn modéré vis-à-vis l'ensemble des souches. Mais Afin d'appréhender ce chapitre dans de bonnes conditions, la vérification de la toxicité aigüe de l'extrait phénolique était indispensable.

I.7.2. Evaluation de la toxicité de l'extrait méthanolique de l'épicarpe de *Punica granatum*

L'étude de la toxicité aiguë est une analyse qualitative et quantitative de l'altération irréversible des fonctions vitales après administration unique d'une substance dans un délai de quelques minutes à quelques jours (2 semaines). Cette toxicité est évaluée en déterminant la dose létale (DL₅₀) c'est-à-dire, la dose unique qui provoque la mort de 50 % des animaux traités.

L'évaluation de la toxicité aiguë a été réalisée selon les Directives du Journal Officiel des Communautés Européennes code 423 OECD (2001)

Pour déterminer la toxicité (dose létale DL₅₀) de l'extrait étudié, différentes doses sont administrées par voie orale à raison de 10 ml/kg aux différents lots de rats âgés de 2 à 3 mois (6 rats dans chacun). un lot témoin recevant de l'eau physiologique pour chaque voie d'administration est nécessaire pour comparer les résultats.

Les animaux sont mis à jeun pendant 24 h et les différentes solutions sont administrées par voie orale, . L'administration est réalisée par gavage à l'aide d'une sonde rigide à bout olivaire au cours desquels sont notées les variations de poids corporel, les signes de toxicité éventuels (modifications comportementales dans et hors cage, chute de poils, éruptions, larmoiement, manifestations digestives et autres, ainsi que le taux de mortalité (Baba Ahmed et *al.*, 2010).

I.7.2.1. Préparation des extraits

Comme étant non toxique et permettant la solubilisation des extraits phénoliques, l'eau physiologique (9 ‰ Na Cl) a été choisi pour la préparation des différentes doses. Les concentrations choisies sont :

- Extrait phénolique : 500, 1000, 2000, 4000,6000 mg/kg de poids corporel



Figure 24 : Administration de l'extrait par gavage

Après l'administration de l'extrait phénolique, les animaux ont été observés individuellement toutes les 30 minutes pendant 6 heures le premier jour et tous les jours pendant 15 jours. Pendant cette période, nous avons enregistré le nombre des rats morts ainsi que le poids corporel et le comportement et les troubles symptomatologiques observés à l'œil nu.

Les principaux signes recherchés sont :(Tahraoui *et al.*, 2010).

- ❖ Contraction abdominale ;
- ❖ Activité : démarche anormale, activité réduite;
- ❖ Respiration : changement de rythme ;
- ❖ Convulsion ;
- ❖ Diarrhée ;
- ❖ Coma ;

S'il existe de mortalité, la dose médiane DL_{50} de l'extrait doit être calculée. Elle peut en effet être déterminée par la méthode de Miller ET Tainter (1944) décrite par Randhawa en 2009 et par l'équation de Dragstedt et Lang (1957) citée par El Allaoui et ses collaborateurs (2011) après application de la formule :

$$DL_{50} = \frac{50 (X_2 - X_1) + (X_1 Y_2 - X_2 Y_1)}{Y_2 - Y_1}$$

- X₂ : Dose supérieure encadrant DL_{50} ;
- X₁ : Dose inférieure encadrant DL_{50} ;
- Y₂ : Pourcentage de mortalité correspondant à X₂;
- Y₁ : Pourcentage de mortalité correspondant à X₁.

I.7.3. Evaluation de l'activité antibactérienne vis à vis *B. cereus*

Cette partie est complexe, elle nécessite tant de paramètres à évaluer pour avoir des résultats plus précis et plus fiables.

I.7.3.1. Préparation de l'inoculum de *Bacillus cereus*

A partir d'une culture jeune de 18 à 24h isolée et identifiée auparavant, nous avons prélevé 3-5 colonies identiques à l'aide d'une pipette Pasteur, puis transférées dans un tube de 10ml de l'eau physiologique stérile. Les tubes sont incubés à 37C° pendant 30min. Le criblage est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 580nm, afin d'obtenir une suspension ayant une charge de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml, une dose susceptible de provoquer une infection intestinale chez les rats (Logan, 1988).

1.7.3.2. Choix de la dose

Suivant les résultats de l'étude de la toxicité aigüe trouvés auparavant, nous avons choisi une dose qui n'a provoqué aucun signe de toxicité grave ou de mortalité pour l'étude *in vivo* qui est 600 mg/kg pour l'extrait méthanolique de *punica granatum*,

I.7.3. Répartition des lots

Deux protocoles ont été réalisés :

Les rats sont répartis (lot A, lot B, lot C, lot D), chaque lot est constitué de dix (10) rats :

- **Lot A « témoin = placebo »** : recevant par voie orale (par gavage), 1 ml d'une solution d'eau distillée (Alwashli et al., 2012).
- **Lot B « traité non infecté »** : recevant par voie orale une solution de l'extrait méthanolique dilué dans 1ml d'eau distillée à raison de 600mg/kg/j pendant 07 jours
- **Lot C « essai + infecté »** : recevant 200 µl d'un inoculum de 10^7 ufc / ml de *Bacillus cereus* par gavage puis traité avec une dose de 600 mg/kg/j par voie orale pendant sept (07) jours.
- **Lot D « infecté non traité »** : recevant 200µl d'un inoculum de 10^7 cellules/ml au jour 0 et restant sous le suivie dans les huit (08) post inoculations.

Pour les rats du lot C, ils suivent un traitement thérapeutique de 600 mg/kg de l'EMPG par voie orale. Le traitement commence 24h après l'inoculation de la souche de *Bacillus cereus* et se poursuit sept (07) jours (Chami, 2005), la figure 25 illustre le protocole établi.

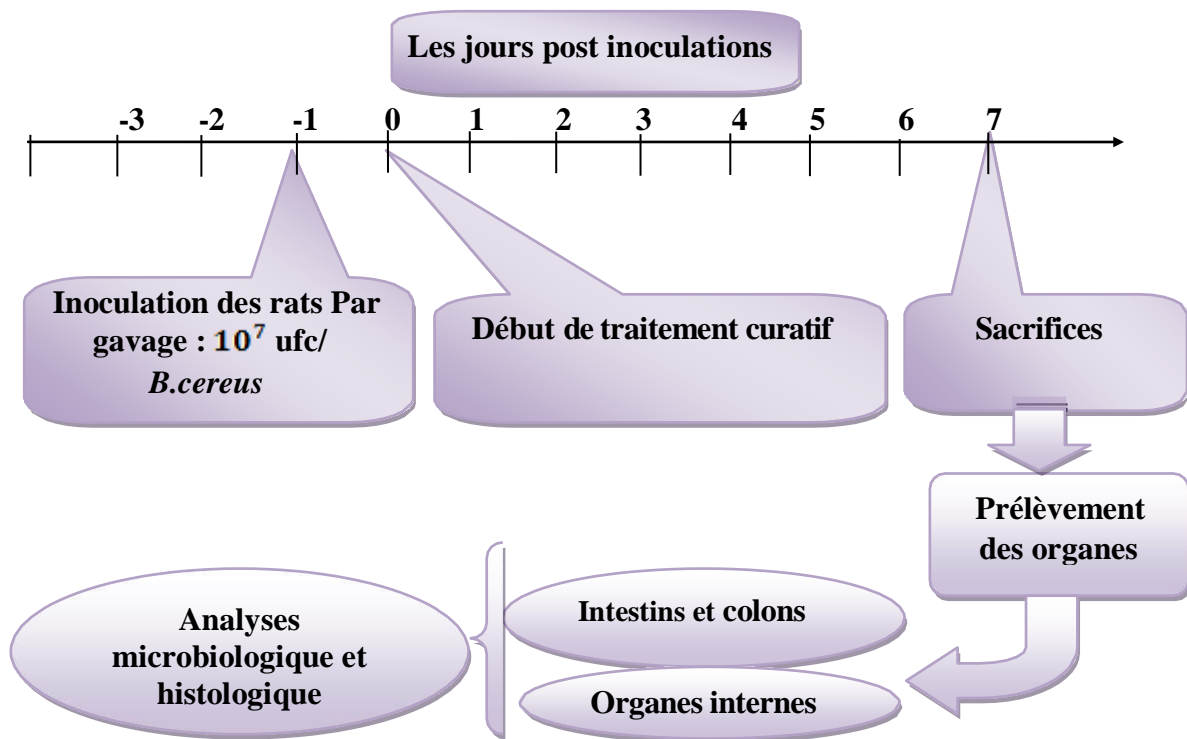


Figure 25 : Protocole expérimental du Traitement curatif chez les rats *wistar* traités avec 600 mg/kg

I734. Evolution pondérale

L'état physiologique des animaux influe sur leur apport en nutriments, ainsi leurs poids corporels. Une diminution de ces derniers peut donc traduire la présence de certains problèmes fonctionnels chez les rats.

Les rats sont pesés quotidiennement tout au long de la période d'expérimentation à l'aide d'une balance électrique (Havelaar *et al.*, 2001). Le poids initial et le poids final de chaque groupe ont été enregistrés et le taux de croissance a été calculé par la relation suivante :

$$\text{Taux de croissance (\%)} = \frac{\text{Pf} - \text{Pi}}{\text{Pi}} \times 100$$

Dont :

- **Pf** : le poids final des rats
- **Pi** : le poids initial des rats

I735. Détection de *Bacillus cereus*

Après l'induction de l'infection, la matière fécale des rats de différents lots est collectée chaque jours, jusqu'à la fin de l'expérimentation dans des sachets de prélèvement stériles à partir des cages individuelles pour déterminer le nombre des rats excréant *Bacillus cereus* dans leurs crottes d'une part et de détecter un symptôme diarrhéique suite à la toxi-infection par la détermination d'humidité de la matière fécale d'autre part (Aranda et Gianella, 1999).

Bacillus cereus dans chaque échantillon est quantifiée comme suite: 1 g of matière fécale et additionnée de 9 ml de d'eau physiologique, homogénéisée et incubée à 37C° pendant 2 heures, la suspension diluée après en série (10⁻¹ to 10⁻⁵) dans l'eau physiologique stérile. Chaque tube est mis dans un bain-marie à 80C°/10mn (Test de thermorésistance). Un Aliquote (0.1ml) de chaque dilution est ensemencé en triplicata dans une gélose Mossel (milieu sélectif). Après incubation à 37C° pendant 8-24 h, des colonies roses confirment la présence de *B.cereus*.

I736. Sacrifices

Avant d'amorcer le sacrifice, on pèse les rats.

Ensuite après avoir préparé le matériel nécessaire préalablement stérilisé et vu la douleur qui sera infligée à l'animal lors des manipulations, pour cela et selon le protocole et la nature des espèces animales, il est recommandé de pratiquer le sacrifice et la dissection sur l'animal sous anesthésie au vapeur de chloroforme dans un dessiccateur pendant quelques minutes dans les meilleurs conditions hygiéniques (Ronald et *al.*, 1993 ; Huberd, 2008). les différents organes internes de translocation (Foie, rate, rein, poumons, cœur, Intestin et colon) sont prélevés soigneusement dans des conditions d'aseptie, pesés, et divisés en deux parties, une partie pour l'analyse microbiologique est mise dans un pot stérile remplis de 9ml d'eau physiologique et l'autre partie est mise dans le formol(10%) pour une étude histologique, le sang est aussi prélevé.(Figure :26)

I737. Le poids relatif des organes internes

Le poids relatif des organes (foie, rein, rate, cœur et poumons) de chaque rat des différents lots a été déterminé par la formule suivante (Baba Ahmed et *al.*, 2010):

$$\text{Poids relatif (\%)} = \frac{\text{Poids de l'organe}}{\text{Poids corporel}} \times 100$$



Figure 26 : Prélèvement des organes

I738 Prélèvement de l'appareil digestif

Le sang est prélevé par ponction cardiaque (Suzuki et *al.*, 1988), un aliquote est récupéré dans des tubes éppendorf stériles pour les analyses microbiologiques.

On prélève l'appareil digestif comme suit :

- ✓ On soulève vers l'avant les lobes du foie qui recouvrent l'estomac. Ce dernier a un aspect d'une poche volumineuse, blanchâtre et incurvée.
- ✓ On prélève la rate.
- ✓ On ligature et on prélève le tube digestif en le mettant dans une boîte de Pétrie en verre stérile contenant de l'eau physiologique stérile afin d'éliminer toute trace de sang



Figure 27 : appareil digestif.

- ✓ On coupe avec soin les méésentères dans laquelle circule un riche réseau vasculaire pour dérouler l'intestin qui s'étend de l'estomac au caecum du gros intestin.
- ✓ On fragmente l'intestin grêle au niveau des trois régions duodénum, jéjunum et iléon.
- ✓ On fractionne ainsi le gros intestin en prenant uniquement le colon

I.7.4. Analyse microbiologique :

C'est une étude sur différents organes des rats tout en évaluant l'effet du *Punica granatum* sur la flore gastrique et qui comprend une étude quantitative de la flore microbienne intestinale en faisant appel aux techniques de dénombrement.

I.7.4.1. Traitement des échantillons

La préparation de l'échantillon nécessitera un broyage couplé à une série de dilutions décimales en solution de l'eau physiologique stérile qui varia selon le segment et la charge microbienne.

On introduit aseptiquement chaque segment d'intestin à analyser dans un sachet de Stomacher stérile contenant au préalable 9ml de diluant (eau physiologique stérile) puis on le broie. Cette suspension constitue alors la dilution mère qui correspond donc à la dilution 10^{-1} .

Après avoir bien homogénéisé la solution mère. On prélève à l'aide d'une pipette Pasteur en stérile 1ml de la suspension de départ puis on introduit ce dernier dans un tube à vis stérile qui contient 9ml du même diluant (eau physiologique stérile). Cette dilution est alors 10^{-2} . On refait les mêmes démarches jusqu'à la dernière dilution (Joseph pierre, 1998).

I7.4.2. Recherche et dénombrement des germes dans le sang et dans les organes de translocation

La translocation bactérienne est définie comme étant le passage des micro-organismes ou de leurs produits (endotoxines et exotoxines), à partir du tractus gastro-intestinal jusqu'à des sites extra-intestinaux les ganglions mésentériques, le foie, la rate ou le sang suite à une augmentation des complications infectieuses (Herek *et al.*, 2000).

Afin de mieux évaluer l'effet du germe pathogène *B. cereus* et l'extrait méthanolique de *punica granatum* sur ce phénomène, nous avons trouvé utile de :

- voir l'effet de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* et du pathogène sur le microbiote intestinal du rat, au niveau de l'iléon et colon ;
- rechercher les germes du tractus intestinal naturellement présents chez le rat dans d'autres organes de translocation (tableau 06).
- vérifier la présence du pathogène dans le sang et/ou dans les organes de translocation pour détecter une éventuelle septicémie.

Tableau 06 : Ensemble des germes recherchés dans les organes de translocation

Germes recherchés	Milieus sélectifs utilisés	Dilution
<i>Bacillus cereus</i>	Gélose Mossel ou gélose au lait	Solution mère
Flore totale aérobie	TGEA	10 ⁻⁵
Flore totale anaérobie	VF	10 ⁻⁴
Lactobacillus	MRS	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴
Entérobactéries	Hektoen	10 ⁻³
Enterocoques	BEA	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	10 ⁻⁴

Pour des raisons statistiques et une meilleure interprétation mathématique, le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon est exprimé en log Unité Formant Colonie (UFC) par gramme d'échantillon selon la formule

$$\text{Log UFC/g d'échantillon} = \text{Nombre de colonies/Dilution} \cdot \text{Volumeensemencé}$$

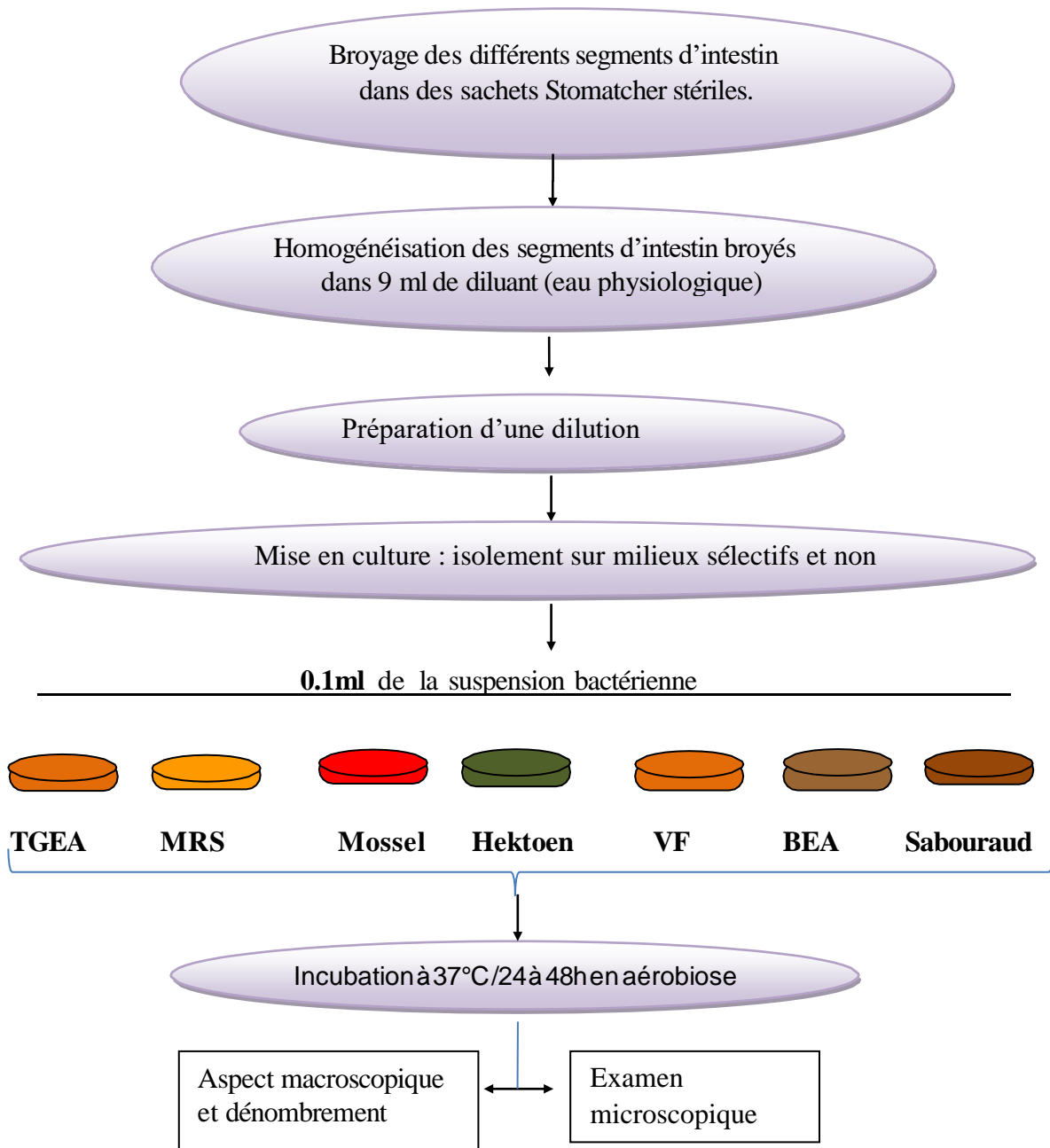


Figure 28 : analyse bactériologique

I.7.5. Etude histologique

L'étude histologique a été réalisée à la fin des expérimentations, après sacrifice des animaux et prélèvement d'organes utilisés dans cette étude : intestin, colon, foie, rate, reins, cœur et poumons.

I751. Fixation des pièces

Les éléments histologiques sont fixés dans le formol à 10%. Les pièces prélevées ont été mises dans des piluliers et recouvertes de formol à 10% (Huberd , 2008), hermétiquement fermés.

I752. Déshydratation

Au niveau du laboratoire, les pièces du pilulier ont été tirées, mises dans des cassettes à inclusion.

Avant de les inclure dans de la paraffine, les pièces doivent être soigneusement déshydratées. La déshydratation est réalisée automatiquement via un appareil spécial. Cet appareil comporte plusieurs flacons déposés en série et remplis d'alcool à concentration croissante (70%, 80%, 90%, 100%) et de xylène pur selon un ordre bien déterminé ou les cassettes contenant les pièces vont séjourner successivement pendant des durées variables.

Le temps total de passage des pièces dans le technicon est de 16h, après cette période les pièces sont récupérées pour passer à l'inclusion.

I753. Inclusion

Le paraffinage à lieu grâce à un appareil muni d'un compartiment alimenté en chaleur pour faire couler la paraffine (65°C), et d'une plaque refroidissant sur laquelle est mis un moule métallique contenant les cassettes ou les pièces sont mises à nu. Une fois les pièces couvertes de paraffine liquide sont laissées refroidir sur une plaque à froid, ainsi, on obtient les blocs qui seront utilisés pour donner de fines coupes (Figure 29).

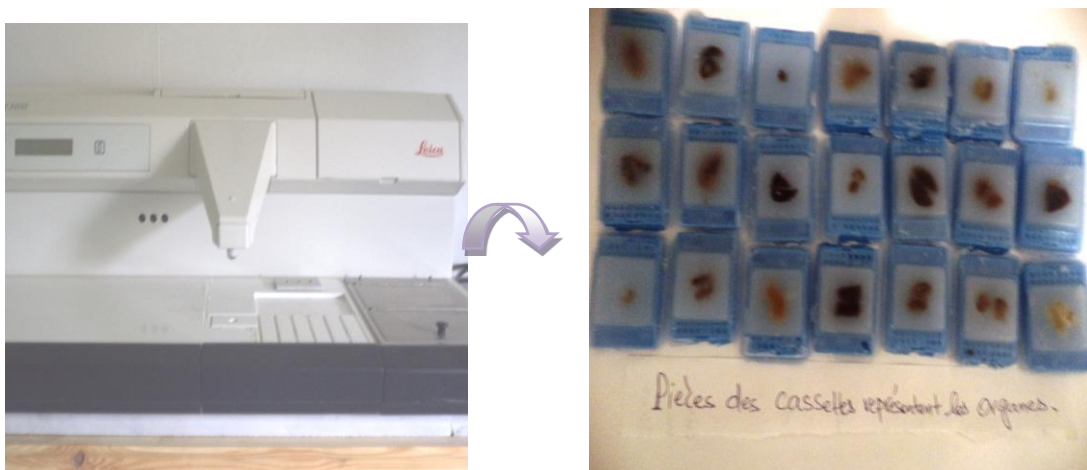


Figure 20 : Inclusion à la paraffine

I754. Coupe des pièces

Cette étape permet d'obtenir des coupes destinées à l'examen au microscope. Ces coupes doivent être minces pour que la lumière les traverse aisément et avoir une solidité suffisante pour être manipulées.

Pour cela un microtome à avance mécanique et couteau d'acier est utilisé qui permet de faire passer les pièces à couper devant la lame, à chaque passage celui-ci enlève une tranche d'épaisseur variable (4 à 6 μm).

Mettre en place la cassette sur le microtome, convenablement orientée, pour présenter correctement la face à couper devant la lame. Celui-ci est à son tour placé et orienté de façon à attaquer la pièce après quelques passages. Pour enlever l'excès de paraffine, lorsque la pièce est affranchie et qu'elle paraît complète dans la coupe sur toute son étendue, on règle l'épaisseur avec un dispositif spécial. Le mouvement remis en marche, à chaque passage de la pièce, il se fait une coupe qui se colle automatiquement au bord de la coupe précédente. Ce qui nous permet d'obtenir un ruban de coupe (Huberd, 2008).

Le ruban fractionné est porté dans un bain-marie à 35°C pour permettre un bon étalement et éviter la formation des plis, puis sur une lame de verre par des aiguilles, La lame est mise dans un plateau, prête pour la coloration.

Les lames ont été toutes marquées sur leur bord pour porter la nature du tissu considéré à l'aide d'un crayon à diamant.

I755. Coloration

La coloration est obtenue en plongeant la coupe dans des bains colorants comme suit :

- 1-** Déparaffiner la coupe : Plonger la lame dans le premier bain de xylène pendant 20mn, puis dans le second pendant 20mn, pour dissoudre la paraffine.
- 2-** Hydrater la coupe : Pour faire disparaître le xylène faire passer la lame dans deux bains d'alcool absolu pendant des durées de trois (03) mn. Faire passer la lame dans l'eau courante, puis dans l'eau distillée.
- 3-** Coloration à l'hématoxyline : Plonger la coupe bien hydratée dans un bain d'hématoxyline pendant 05 mn, faire un lavage à l'eau courante puis la faire passer dans l'eau distillée.
- 4-** Coloration à l'éosine : Plonger la lame dans le bain d'éosine pendant 03 mn, puis effectuer un lavage à l'eau courante.

5- Déshydratation : Faire passer la lame dans l'alcool absolu, puis dans le xylène, ensuite la plonger dans un bain de xylène pendant 03 mn.

6- Montage : Déposer une goutte d'une solution permettant l'adhésion sur la lame, et présente une lame couvre- objet propre et sèche en l'inclinant progressivement de façon que la solution s'étende peu à peu et recouvre la coupe sans emprisonner les bulles d'air. La solution ne doit pas déborder, la lamelle est adhérente et la préparation prête pour l'observation microscopique.

7-Observation au microscope et prise de photos : les lames passent ensuite à l'observation au microscope optique à différents grossissements X100, X400. Un tri judicieux a été réalisé puis les lames sont prises en photo numérique.

I7.6. Analyse statistique

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type.

Les résultats de l'activité antimicrobienne in vitro sont triés par le logiciel R , ce dernier est un logiciel de statistique créé par Ross Ihaka & Robert Gentleman [RB1]. Il est à la fois un langage informatique et un environnement de travail: les commandes sont exécutées grâce à des instructions codées dans un langage relativement simple, les résultats sont affichés sous forme de texte et les graphiques sont visualisés directement dans une fenêtre qui leur est propre. C'est un clone du logiciel S-plus qui est fondé sur le langage de programmation orienté objet S, développé par AT&T Bell Laboratories en 1988 [RB2]. Ce logiciel sert à manipuler des données, à tracer des graphiques et à faire des analyses statistiques sur ces données

L'analyse Anova a été réalisé sur les résultats de l'étude in vivo et un test « t » de Student a été appliqué ; un $P < 0,05$ est considéré comme significatif.

II Résultats et Discussion





II. Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. L'eau, les mélanges aqueux du éthanol sont généralement utilisés pour l'extraction (Turkmen et *al.*, 2007).

La solubilité des composés phénoliques est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé. Le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (Falleh et *al.*, 2008). Le méthanol aqueux 70% est deux fois plus efficace que le méthanol pur, pour l'extraction des composés phénoliques (Vuorela, 2005). La lecture de rendement d'extraction montre que le rendement obtenu par l'extrait méthanolique est important avec une valeur de 28.5% (Figure 30).

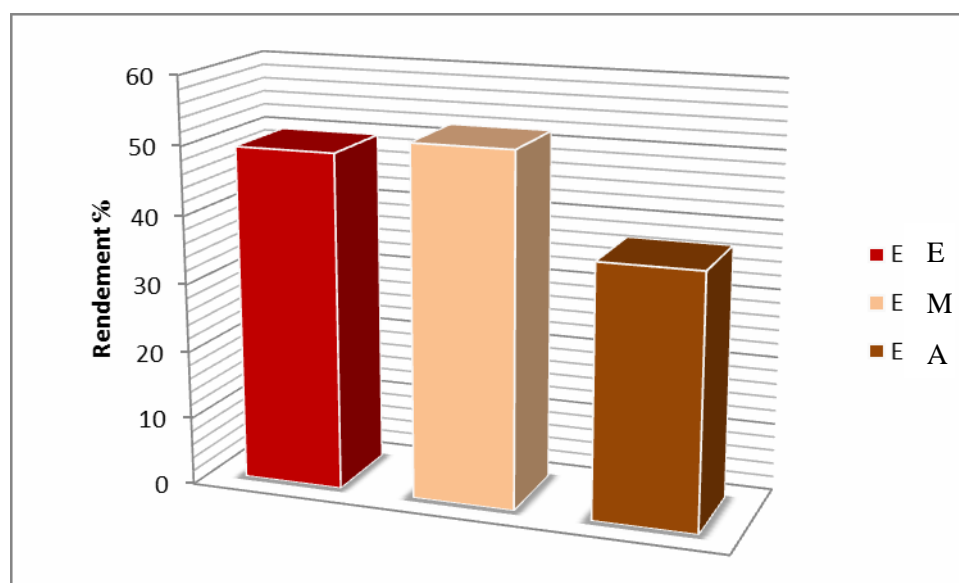


Figure 30 : Rendement d'extraction des polyphénoles

II.2. Analyses phytochimiques

II.2.1. screening phytochimique

L'analyse phytochimique réalisée sur différents extraits de l'épicarpede *Punica granatum* a donné les résultats mentionnés dans le tableau 07. La méthode de détection des différentes familles de composés consiste en une précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques. En effet, ces réactions se traduisent par l'apparition d'une turbidité, floculation ou changement de couleur qui nous renseigne sur la nature des familles existantes dans l'extrait.



Tableau 07: Résultats des tests phytochimiques réalisés sur les extraits phenoliques de *Punica granalum*.

Composés recherchés	Résultats
Flavonoides	+++
Tanins	+++ (galique)
Saponosides	++
Anthocyanosides	++
Anthracénosides	+++
Coumarines	-
Composés reducteurs	+++
Heterosides	-
Alcaloides	-
Amidon	-

(+++): Fortement présent; (+) Moyennement présent; (+) : Faiblement présent; (-) test négatif

D'après le tableau précédent, les tests phytochimiques révèlent que l'épicarpe de *Punica granatum* est très riche en tanins, en flavonoïdes, en anthracénosides et en composés réducteurs, tandis que les anthocyanosides et les saponosides sont moyennement présents. Les alcaloïdes, les stéroïdes, les coumarines et l'amidon sont révélés négatifs dans cette analyse.

II.2.2. Dosage des polyphénols totaux ,flavonoides,flavones et tannins condensés

Les composés phénoliques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité anti-oxydante des plantes (Li et al., 2007). Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antivirale, antiallergique, antithrombotique et vasodilatatrice qui peuvent être reliées à leur activité anti-oxydante (Gulcin et al., 2010). C'est la raison pour laquelle, les dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins de *punica granatum* ont été effectués dans cette étude.

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin- Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures . L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisuthisakul et al., 2008).

La teneur des poly phénols totaux de différents extraits est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg) par l'équation type : $y = 0.01 x + 0.05$ (figure 31).

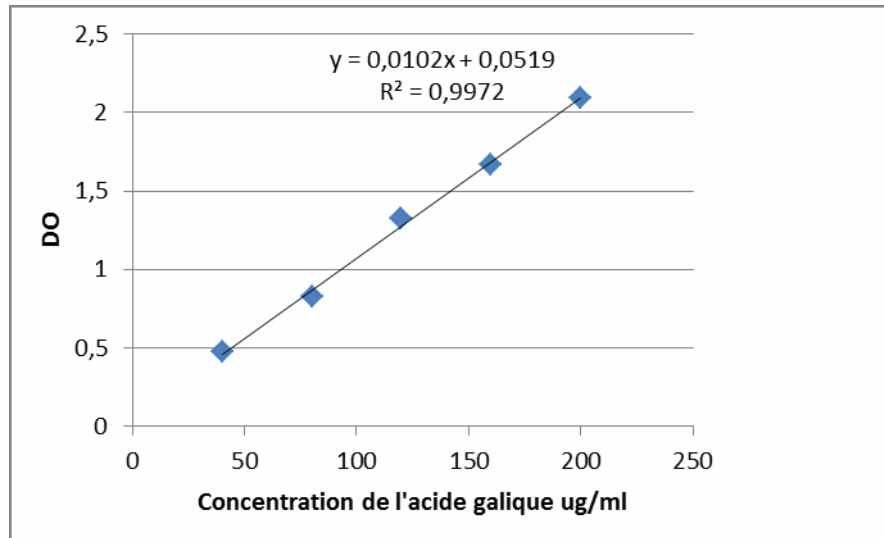


Figure 31. Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux La

concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (2-14 µg/ml) et exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) par l'équation : $y = 0.01 x + 0.17$ (figure 32).

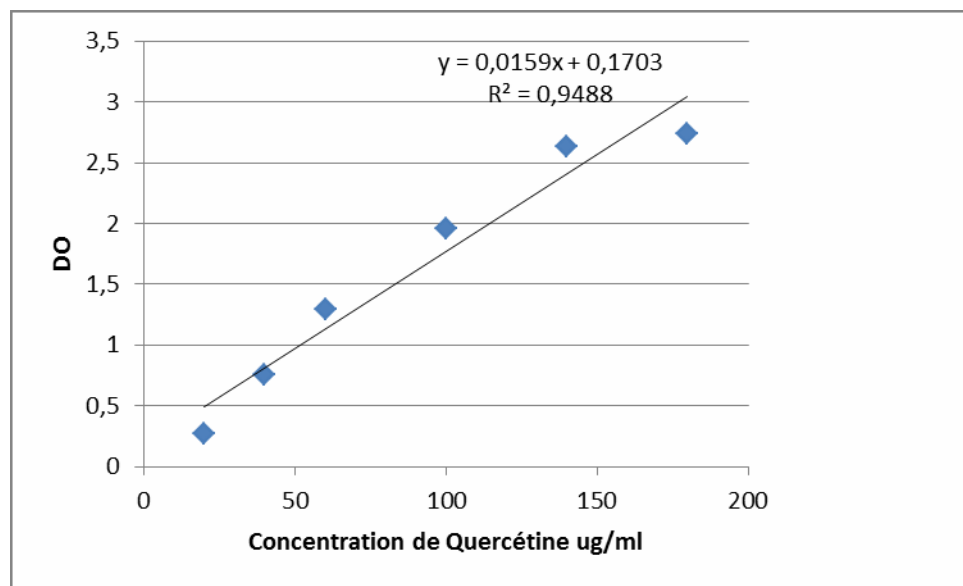


Figure 32. Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/mg d'extrait) par l'équation $y = 0.008 x + 0.137$ (Figure 33)

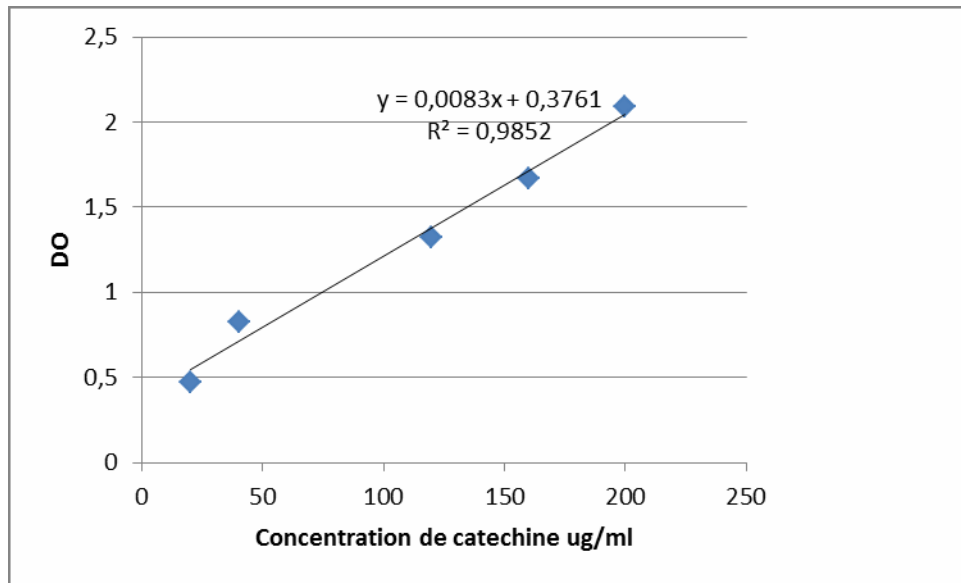


Figure 33. Droite d'étalonnage du catechine pour le dosage des tanins condensés

La concentration des flavones dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (2-14 µg/ml) et exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) par l'équation : y

$$= 0.007 x + 0.02 \text{ (figure 34)}$$

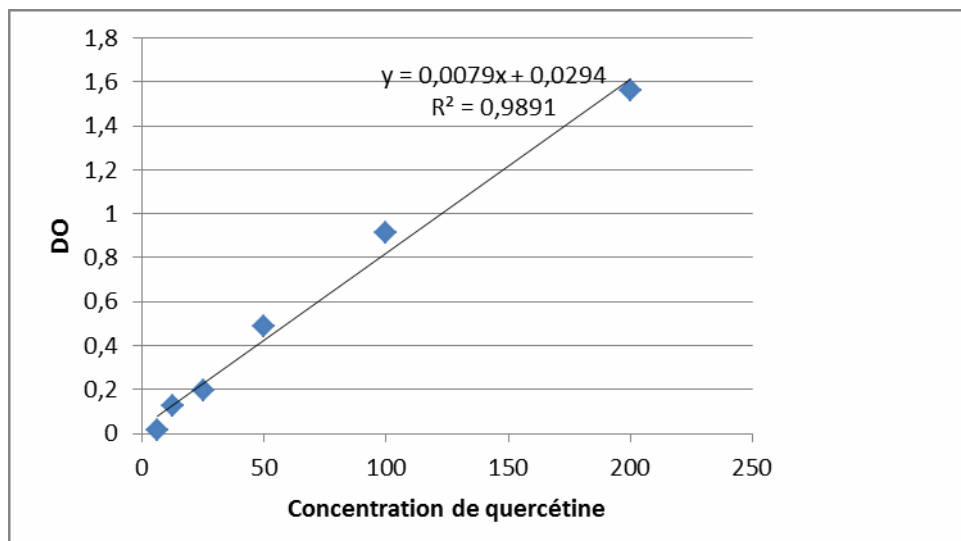


Figure 34. Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones

A la lumière de ces courbes d'étalonnage, le contenu phénolique total ,flavonoïdes, flavones et tanins condensés de l'épicarpe de *punica granatum* est représenté dans la figure suivante :

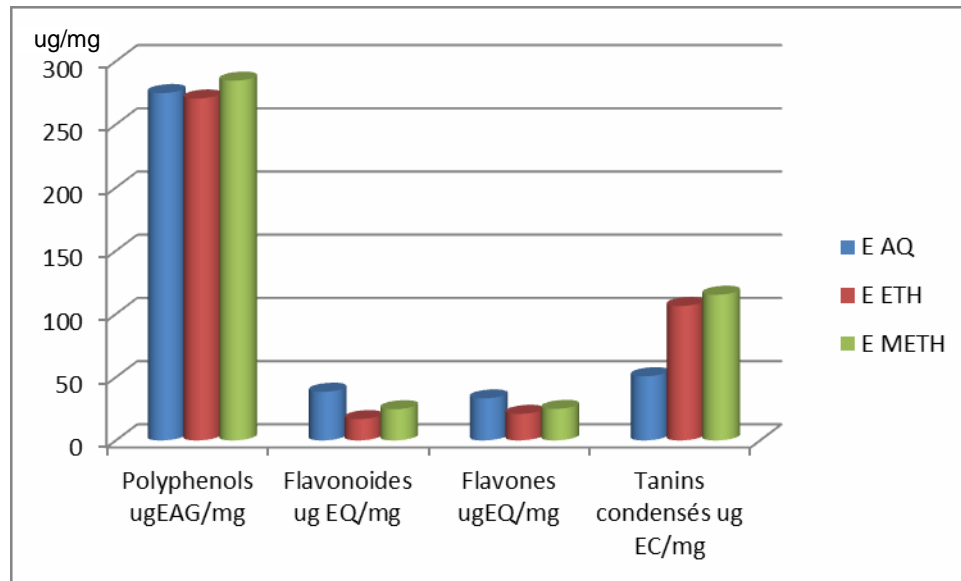


Figure 35 : la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes ,flavones et tannins condensés des extraits de *punica granatum* (ug/mg d'extrait)

Selon les résultats illustrés ci-dessus , on remarque que la teneur en polyphénols dépend de la polarité de solvant . Nos résultats que les extrais sont riche en polyphénols dont les valeurs de polyphénols totaux allant de 194.96 ug EAG/mg à 336.14 ug EAG/mg , alors que la teneur en flavonoïdes varie entre 9.54 ug EC/mg et 27 ug EC/mg tandis que les valeurs de falavones et tannins condensé variant entre 19.96 ug EQ/mg à 39.01 ug EQ/mg et de 81.86 ug EC/mg à 153 ug EC/mg respectivement.

Généralement, toutes les plantes de la famille des Punicaceae sont connues pour leurs composés phénoliques (Walde , 2009). Ceci est en accordance avec nos résultats .

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. (Ozturk et *al.*, 2007).

Généralement et selon la littérature scientifique, le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement selon plusieurs facteurs :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agression et maladie ...etc. (Ebrahimi et *al.*, 2008).
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (Miliauskas et *al.* ,2004), le type de polyphénol, l'état de santé de fruit, la méthode de récolte et de stockage (Stratil et *al.*,2007).



- La méthode d'extraction et la méthode de peuvent également influencer l'estimation de la teneur des polyphénols totaux (Lee et *al.*,2003).

Il a été prouvé que les teneurs de polyphénols totaux sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (Piquemal, 2008).

II.2.3. Identification et quantification des composés phénoliques de l'extrait méthanolique des par HPLC

Les composés phénoliques sont identifiés à partir de leurs longueurs d'onde et de leurs temps de rétention. L'identification des composés phénoliques est effectuée en comparant les pics trouvés à des étalons de références bien déterminés. Le pic de chaque molécule est intégré et sa surface est ainsi notée en tenant compte des solutions standard qui nous ont permis d'étalonner l'appareil HPLC. Les 11 composés sélectionnés pour la calibration sont analysés à leur longueur d'onde d'absorption maximale.

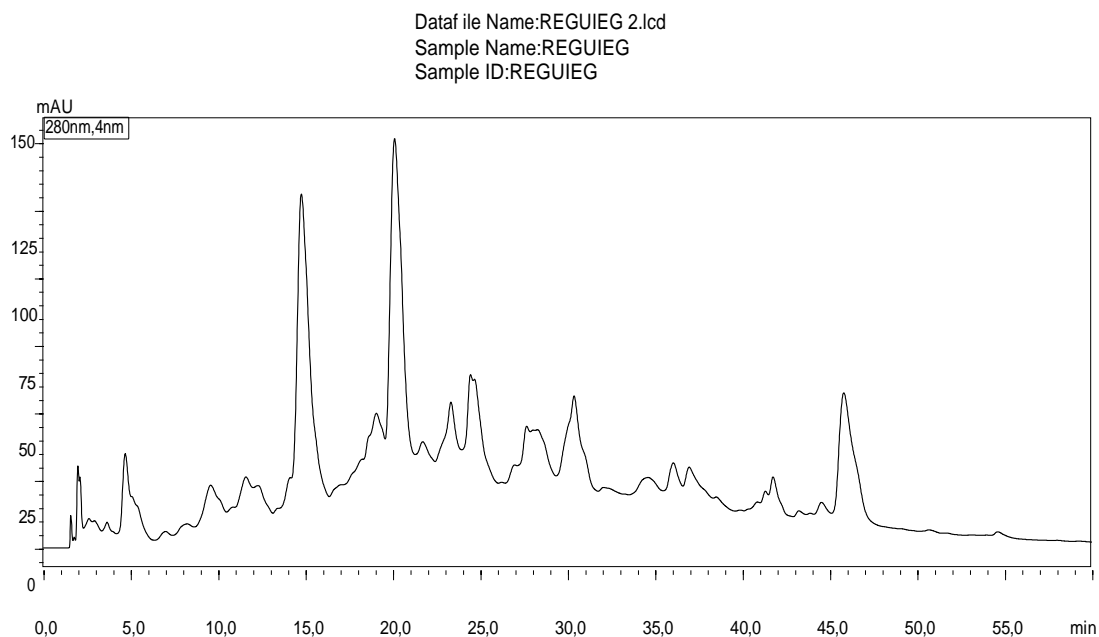


Figure 36. Chromatogramme des composés phénoliques dans l'extrait phénolique de *punica granatum*

Des composés phénoliques purs ont été utilisés dans l'analyse comme standards, en comparant les temps de rétention des composés phénoliques standards avec les pics de chromatogramme de l'extraits analysé (tableau 08).



Tableau 08 : Composés phénoliques détectés dans l'extrait méthanolique de *punica granatum*. analysé par HPLC.

N° de pic	Composés phénoliques détectés	Temps de rétention	Pourcentage
1	Acide gallique	4.69	3.86
2	Catéchine	9,587	2.85
3	Epicatéchine	14,775	16.08
4	Phloridzine	19,065	5.16
5	Acide ellagique	20,107	17.76
6	Acide chlorogénique	21,71	2.87
7	Acide caféique	23,329	4.89
8	Acide p-coumarique	24,67	3.83
9	Acide férulique	28,278	3.37
10	Rutine	30,374	5.42
11	Quercétine	45,804	7.54

Dans cette étude nous avons pu identifier et quantifier 11 composés phénoliques, qui sont des acides hydroxybenzoïques tels que les acides gallique et ellagique, acides hydroxy cinnamiques tels que les acides chlorogénique, caféique, p-coumarique et férulique, flavan-3-ols comme la catéchine et épicatechine, dihydrochalcones tels que la phloridzine, les flavonols comme la quercétine et flavonols glycosides tels que la rutine.

Il faut mentionner que les concentrations indiquées dans ce travail ne représentent que les formes libres des composés phénoliques, car aucune hydrolyse n'a été appliquée aux échantillons avant analyse HPLC. En outre, des études antérieures ont montré la présence d'acide gallique, la quercétine, la catéchine, l'acide chlorogénique et o-coumarique dans le grenadier (Artik et al., 1998).

Dans ce présent travail, l'extrait phénolique contient de l'acide ellagique, avec une concentration plus élevée cet extrait devrait avoir un effet bénéfique sur la santé humaine, puisque ce composé est connu par ses propriétés antimutagéniques, antivirales et antioxydantes (Bhargava et Westfall. 1968). Amakura et al. (2000) a constaté que l'acide ellagique est un acide phénolique important avec une capacité antioxydante élevée.



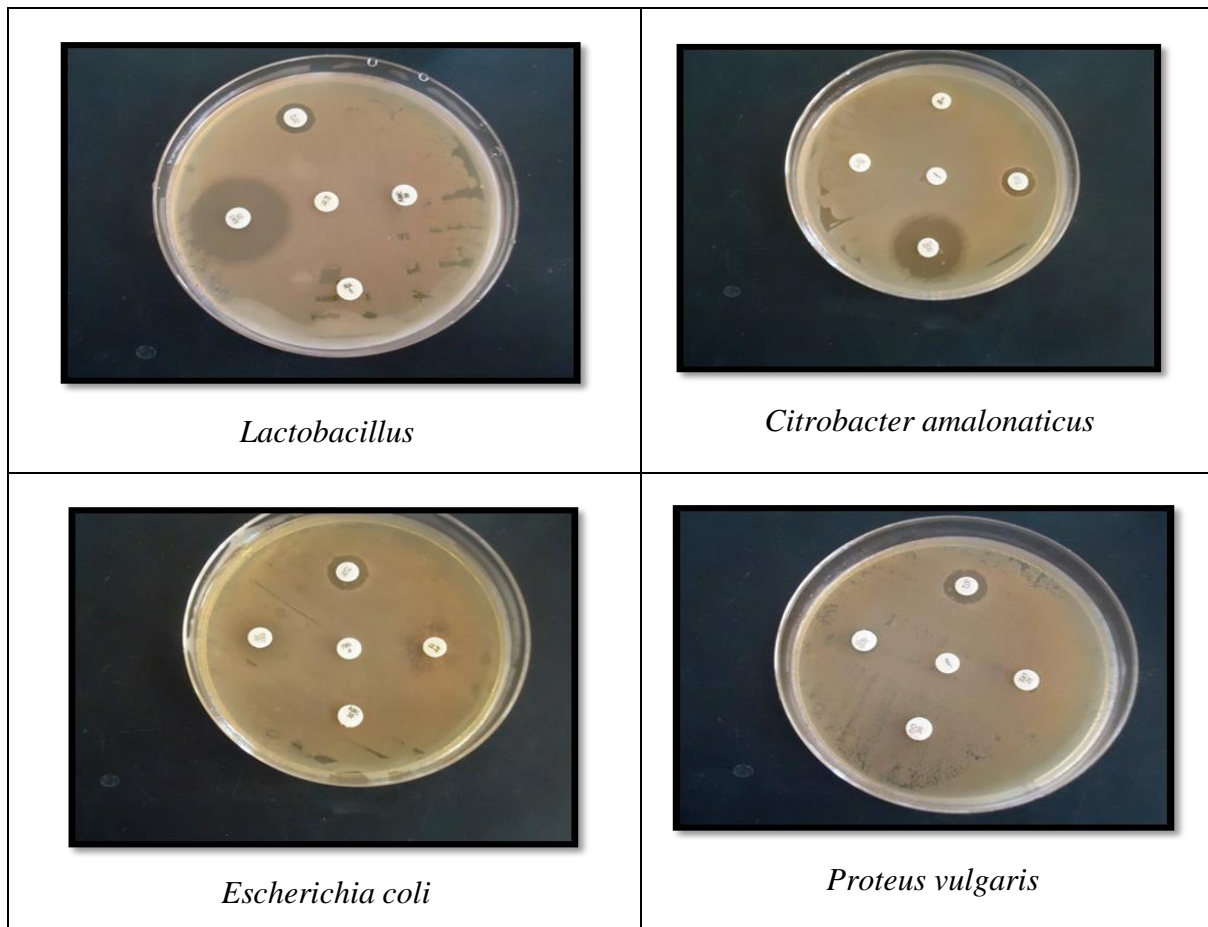
II.4. Sensibilité des souches vis-à-vis les différentes antibiotiques

L'interprétation de l'antibiogramme (sensible, intermédiaire et résistante) a été faite conformément aux recommandations de la société française (SFM, 2010). (Tableaux 9 et 10)

Tableau.09. Diamètre de la zone d'inhibition des antibiotiques.

Les souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition *(mm)				
	Gentamycine	Tétracycline	Colistine	Aztreoname	Pénicilline G
<i>Klebseila pneumoniae</i>	R	I	I	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	I	S	I
<i>Staphylococcus aureus</i>	I	S	S	R	R
<i>Streptococcus intermedius</i>	R	S	S	R	I
<i>Escherichia coli</i>	R	I	R	R	R
<i>Enterobacter agglomerans</i>	R	S	S	S	R
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	R	S	R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	R	I	R
<i>Lactobacillus</i>	R	R	R	R	S
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	R	R	R	R	I

Tableau 10 : l'antibiogramme de quelques souches testées





II.5. Activité antimicrobienne des extraits phénoliques

L'activité antimicrobienne des extraits phénoliques de *punica granatum* est évaluée sur 10 souches bactériennes. Cette activité est évaluée par la méthode d'aromatogramme, le pouvoir antimicrobien des extraits phénoliques est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en mm.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Il apparaît que la majorité des souches microbiennes testées sont inhibées au moins par l'un des extraits sauf pour *Proteus vulgaris* et *Citrobacter amalonmerans* qui sont révélées résistantes vis-à-vis les différents extraits phénoliques, ce qui confirme le spectre large de l'activité antimicrobienne de ce fruit. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (Ponce et al., 2003).

Selon nos résultats, les extraits ont une activité très diversifiée et variable, ils s'attaquent sur les souches testées avec une intensité différente selon la concentration, le type d'extrait et les souches microbiennes c'est pour ces raisons qu'on les présentés sous forme de tableaux de la manière suivante :

Tableau.11. Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait Aqueux.

Les souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition *(mm)			
	les concentrations de l'extrait Aqueux en mg/ml			
	12.5	25	50	100
<i>Klebseila pneumoniae</i>	11±0,03	14±0,001	19±0,07	21±0,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13±0,06	15±0,02	17±0,01	19±0,06
<i>Staphylococcus aureus</i>	17±0,001	21±0,03	26±0,06	29±0,01
<i>Streptococcus intermedius</i>	14±0,02	18±0,07	25±0,001	29±0,03
<i>Escherichia coli</i>	13±0,01	15±0,03	18±0,02	21±0,07
<i>Enterobacter agglomerans</i>	11±0,05	12±0,002	14±0,09	17±0,01
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	7±0,07	8±0,02	8±0,04	9±0,07
<i>Lactobacillus</i>	13±0,002	16±0,03	17±0,05	19±0,02
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	12±0,002	15±0,07	17±0,05	18±0,04
<i>Proteus vulgaris</i>	07±0,03	07±0,03	08±0,03	10±0,05

(*) Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques par l'ajout de 15 µL d'extrait (Diamètre du disque est inclus) les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ±SD.

**Tableau.12.** Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait éthanolique.

Les souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition *(mm)			
	les concentrations de l'extrait éthanolique en mg/ml			
	12.5	25	50	100
<i>Klebseila pneumoniae</i>	12±0,06	13±0,01	18±0,02	22±0,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13±0,03	16±0,001	17±0,03	19±0,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	17±0,001	20±0,07	25±0,06	29±0,03
<i>Streptococcus intermedius</i>	14±0,07	19±0,03	26±0,02	29±0,01
<i>Escherichia coli</i>	13±0,03	16±0,06	18±0,001	22±0,02
<i>Enterobacter agglomerans</i>	12±0,05	13±0,02	17±0,08	17±0,09
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	10±0,06	11±0,001	10±0,03	11±0,06
<i>Lactobacillus</i>	14±0,002	18±0,06	20±0,06	21±0,03
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	14±0,06	16±0,03	17±0,02	20±0,01
<i>Proteus vulgaris</i>	07±0,04	08±0,01	10±0,001	8±0,03

(*) Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques par l'ajout de 15 µL d'extrait (Diamètre du disque est inclus) les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ±SD.


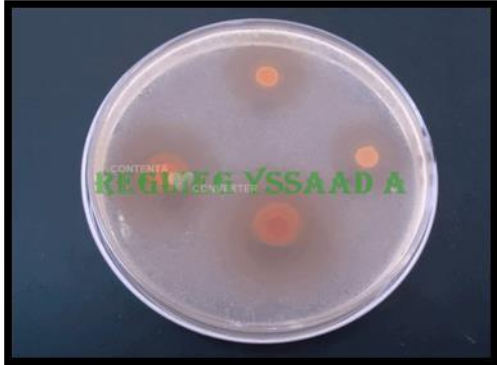

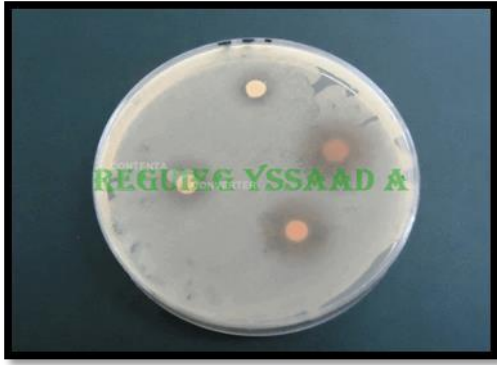


Tableau.13. Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait méthanolique.

Les souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition *(mm)			
	les concentrations de l'extrait méthanolique mg/ml			
	12.5	25	50	100
<i>Klebseila pneumoniae</i>	13±0,03	16±0,06	19±0,02	23±0,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14±0,001	15±0,03	18±0,001	21±0,03
<i>Staphylococcus aureus</i>	17±0,07	20±0,02	29±0,01	34±0,01
<i>Streptococcus intermedius</i>	15±0,03	19±0,06	25±0,07	30±0,001
<i>Escherichia coli</i>	13±0,06	16±0,001	19±0,03	24±0,06
<i>Enterobacter agglomerans</i>	12±0,05	14±0,04	16±0,06	19±0,05
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	9±0,001	9±0,03	11±0,001	10±0,07
<i>Lactobacillus</i>	12±0,02	16±0,02	19±0,02	22±0,01
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	14±0,03	19±0,06	25±0,07	21±0,001
<i>Proteus vulgaris</i>	08±0,04	09±0,006	9±0,03	10±0,05

(*) Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques par l'ajout de 15 µl d'extrait (Diamètre du disque est inclus) les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ±SD.



Tableau 14 : Sensibilité des souches testées vis-à-vis les extraits phénoliques.

	
<i>Sensibilité de Staphylococcus aureus vis-à-vis l'extrait methanolique</i>	<i>Sensibilité de Staphylococcus aureus vis-à-vis l'extrait ethanolique</i>
	
<i>Sensibilité de Klebsiella pneumoniae vis-à-vis l'extrait methanolique</i>	<i>Sensibilité de Klebsiella pneumoniae vis-à-vis l'extrait aqueux</i>
	
<i>Sensibilité de Streptococcus intermedius vis-à-vis l'extrait aqueux</i>	<i>Sensibilité de Escherichia coli vis-à-vis l'extrait aqueux</i>



Sensibilité de *Streptococcus intermedius* vis-à-vis l'extrait méthanolique



Sensibilité de *Escherichia coli* vis-à-vis l'extrait méthanolique



Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis l'extrait méthanolique



Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis l'extrait aqueux



Sensibilité de *Lactobacillus* vis-à-vis l'extrait méthanolique

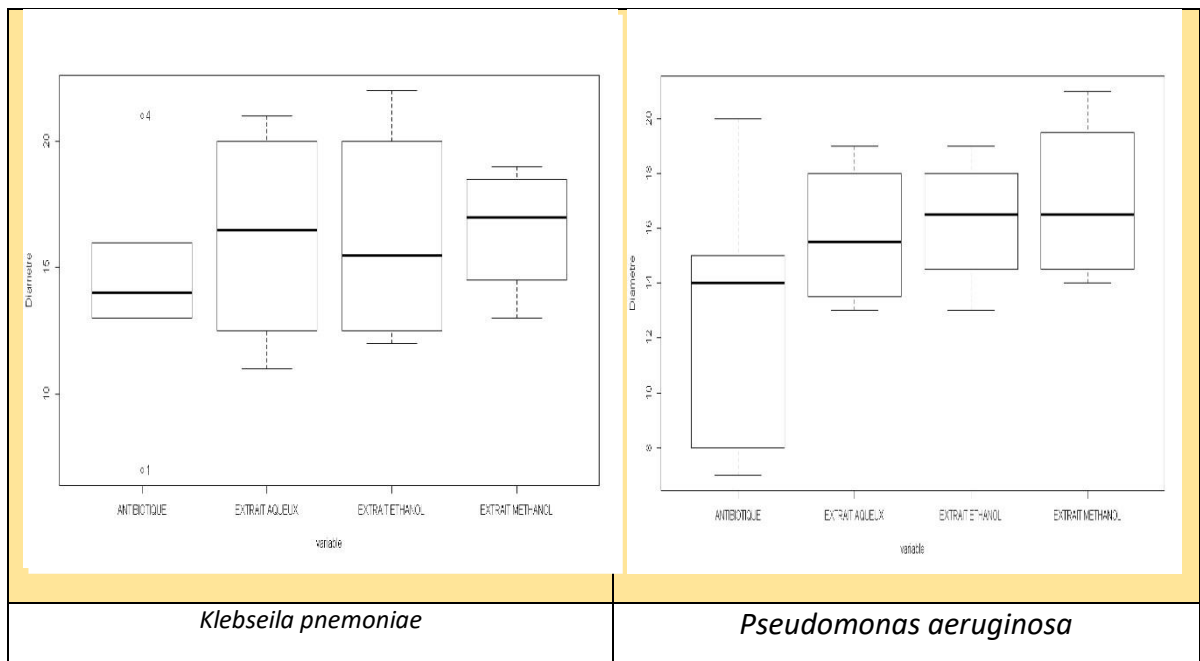


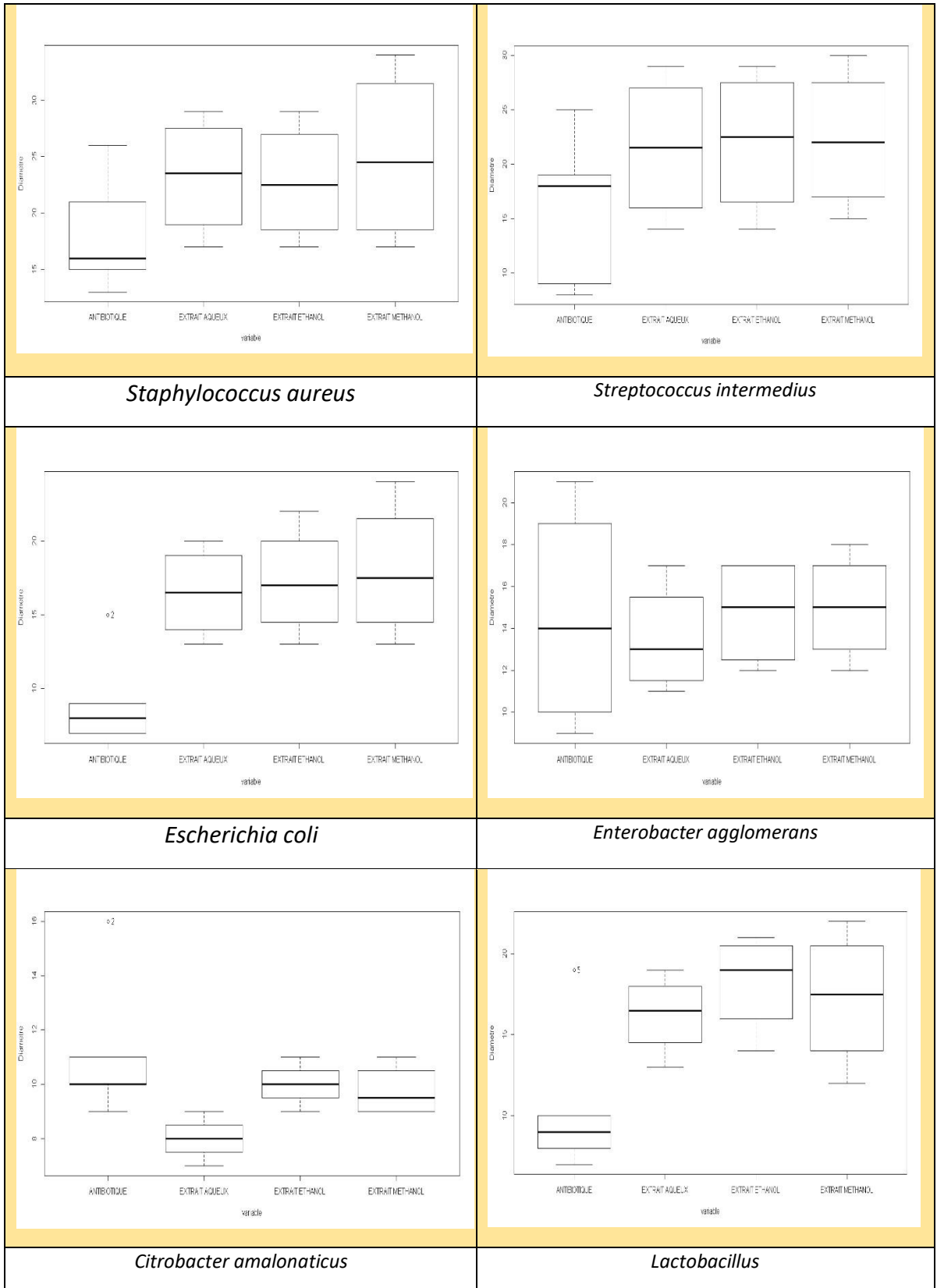
Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis l'extrait méthanolique

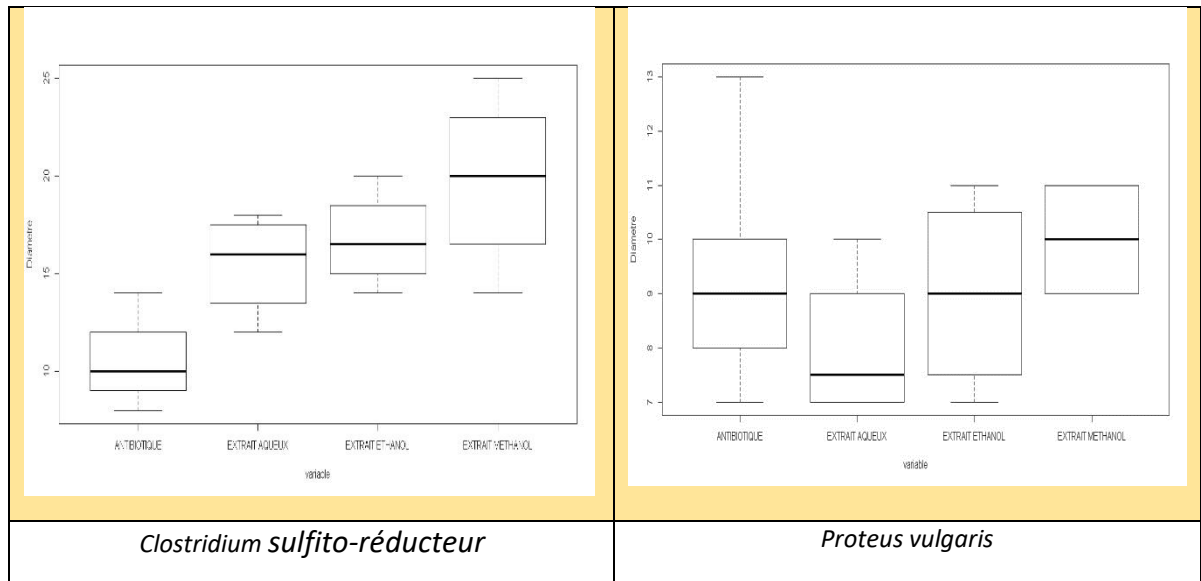


<p>Sensibilité de <i>Proteus vulgaris</i> vis-à-vis l'extrait methanolique</p>	<p>Sensibilité de <i>Enterobacter agglomerans</i> vis-à-vis l'extrait methanolique</p>
<p>Sensibilité de <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis l'extrait ethanologique</p>	<p>Sensibilité de <i>Lactobacillus</i> vis-à-vis l'extrait methanolique</p>

Tableau 15 : Représentation des résultats de l'activité antimicrobienne par le logiciel R (boite a moustaches)







La boîte à moustaches une traduction de *Box & Whiskers Plot*, est une invention de TUKEY (1977) pour représenter schématiquement une distribution. Cette représentation graphique peut être un moyen pour approcher les concepts abstraits de la statistique.

Cette représentation permet de visualiser plusieurs paramètres de distribution d'une variable : la médiane, l'intervalle interquartile et la valeur maximale et minimale de la distribution.

Nous pouvons avoir une idée de la tendance centrale des valeurs de chaque boîte en observant la position de la médiane. Si la médiane n'est pas au centre, on peut juger de la symétrie de la distribution (aplatissement et asymétrie).

Par la longueur de la boîte, il est possible d'estimer la variabilité des valeurs pour chaque sous-groupe. Enfin, la longueur des « moustaches » donne une idée de la taille de la queue de la distribution. Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques sont interprétés de la manière suivante :

Klebsiella pneumoniae

La tendance centrale des trois extraits semble supérieure par rapport aux antibiotiques. Elle exprime une symétrie parfaite pour les extraits. La variabilité des valeurs est sensiblement importante pour les extraits méthanolique et éthanolique. Ce qui montre que cette souche présente une sensibilité forte vis-à-vis de ces derniers extraits que l'extrait aqueux.



Pseudomonas aeruginosa

La distribution des valeurs des extraits présentent une symétrie, tandis que la longueur de la boîte des antibiotiques exprime la forte hétérogénéité. Parce que cette souche est inhibé par l'ensemble des extrait alors que pour les antibiotiques la sensibilité est hétérogène, sensible, intermédiaire et même résistante

Staphylococcus aureus

La position de la médiane des trois extraits est sensiblement découpe les distributions en séries de classes égales. L'intervalle interquartile est ainsi la longueur des valeurs sont visiblement davantage par rapport les antibiotiques. Ce qui révèle que les antibiotiques et les extraits phénolique présentent une activité antibactérienne identique sur cette souche

Streptococcus intermedius

La tendance centrale des trois extraits semble identique est possède une symétrie parfaite parce que les trois extraits phénoliques agissent avec la même façon sur cette souche

Escherichia coli

Les valeurs des trois extraits prennent une longueur par rapport les valeurs des antibiotiques. Les extraits aqueux, éthanolique et les antibiotique possèdent une symétrie parfaite. Ces paramètres indiquent que cette souche présente une résistance vis-à-vis l'ensemble des antibiotique tandis que elle trop sensible pour les extraits phénoliques notamment l'extrait méthanolique.

Enterobacter agglomerans

La distribution des valeurs des extraits méthanol suit une loi normale. Les valeurs des antibiotiques sont supérieurs par rapport les autres extraits. Les diamètres de la zone d'inhibition dans le cas des antibiotiques est des fois plus important que celle chez les extraits phénoliques



Citrobacter amalonaticus

Les valeurs des extraits suivent une loi normale. Malgré l'infériorité des extraits par rapport les antibiotiques. Ce qui prouve que les extraits phénoliques ne possèdent aucune activité sur cette souche tandis qu'elle est sensible vis-à-vis les antibiotiques

Lactobacillus

La longueur et l'intervalle interquartile des trois extraits sont vraisemblablement supérieurs par rapport les antibiotiques. Les valeurs des extraits méthanol possèdent une symétrie parfaite. Le pouvoir antibactérien des extraits phénoliques est plus important que celle des antibiotiques de même l'extrait méthanolique présente la forte activité même avec des concentrations faibles

Clostridium sulfito-réducteur

La tendance centrale des extraits suit une loi normale. Les valeurs des antibiotiques reste inférieur par rapport les autres extraits. Ce qui montre que cette souche est trop sensible aux extraits phénoliques par apport aux antibiotique

Proteus vulgaris

La distribution des valeurs des extraits éthanols suit une loi normale. La longueur et les intervalles interquartiles des antibiotique sont supérieurs par rapport les autres extraits. Contrairement aux souches précédentes , cette souche ne présente aucune sensibilité vis-à-vis les extraits phénoliques .

L'évaluation de l'activité antimicrobienne montré une grande hétérogénéité dans les résultats. L'extrait méthanolique de *punica granatum* a présenté le meilleur effet dans cette méthode avec la plus grande zone d'inhibition enregistrée contre *staphylococcus aureus* de $34 \pm 0,01$ mm, elle est plus supérieure au diamètre donné par l'action des antibiotiques.

Ceci est prouvé par l'étude de Chaabane *et al.*, (2012) sur un écotype provenant de Mascara ou l'extrait méthanolique avait une activité inhibitrice intéressante d'un diamètre de 29mm .

Ces résultats corroborent ceux de Reddy et al (2007) qui ont démontré que des extraits de grenade présentent une activité antimicrobienne significative contre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*



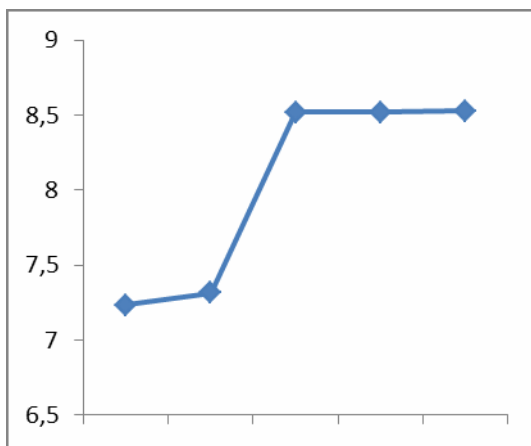
et *S.aureus*, ceux de Al-Zoreky (2009) qui a montré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *S. aureus* et *E. coli* et ceux de Choi et al (2009) qui ont étudié l'effet in vivo et in vitro de l'application de diverses concentrations d'extraits d'écorce de grenade pour inhiber la croissance de la Salmonelle.

Cette activité antimicrobienne de cet extrait est due, au moins partiellement, à la présence des polyphénols. Cela est confirmé par d'autres recherches qui ont attribué l'activité antimicrobienne à la présence des polyphénols.

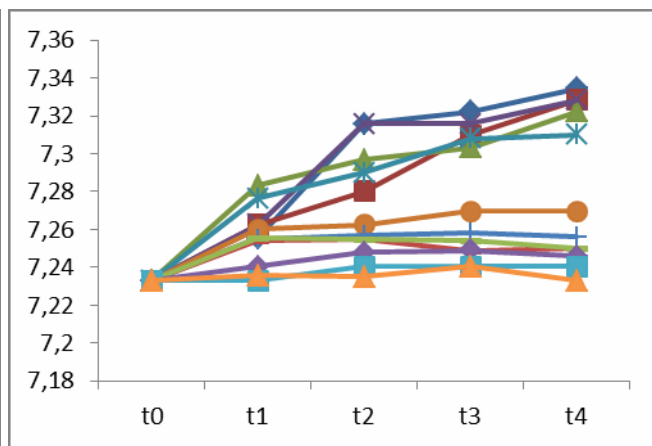
D'après les résultats des tests antibactériens, on constate que les souches bactériennes présentent une sensibilité importante. Et cette dernière liée à la composition de la membrane de la bactérie (Gram positive et Gram négative) et la nature de composant majeur de l'extrait.

Les résultats de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide par la méthode de micro dilution sont présentés dans le tableau suivant :

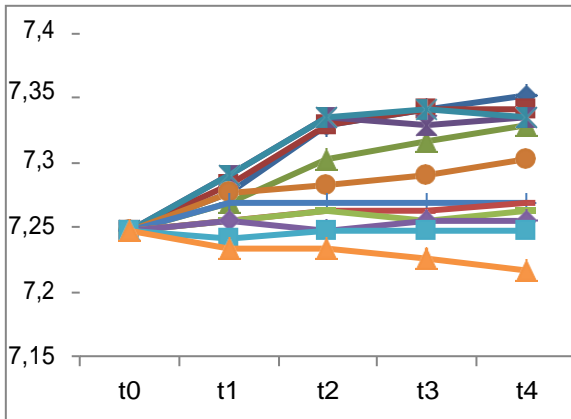
Tableau 16 : cinétique de croissance des souches testées en présence et en absence des extraits phénoliques



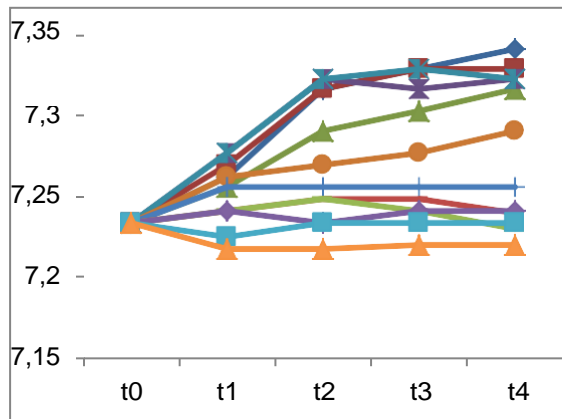
Cinétique de croissance de *Klebsiella pneumoniae* en absence de l'extrait phénolique



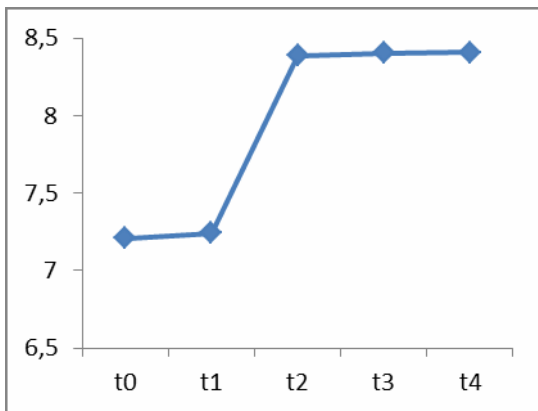
Cinétique de croissance de *Klebsiella pneumoniae* en présence de l'extrait aqueux



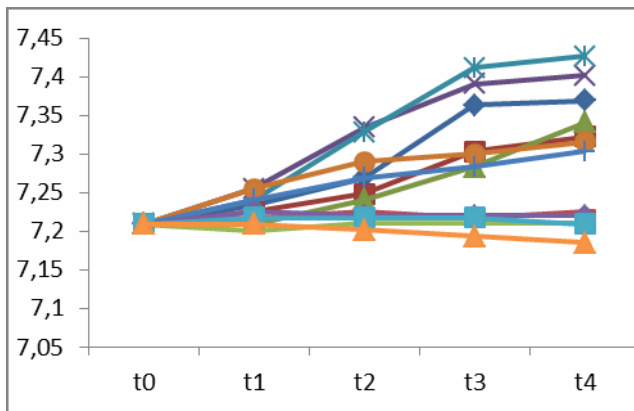
Cinétique de croissance de *Klebsiella pneumoniae* en présence de l'extrait éthanolique



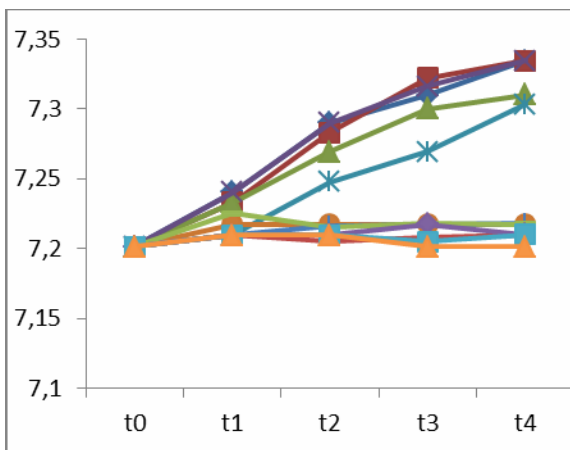
Cinétique de croissance de *Klebsiella pneumoniae* en présence de l'extrait méthanolique



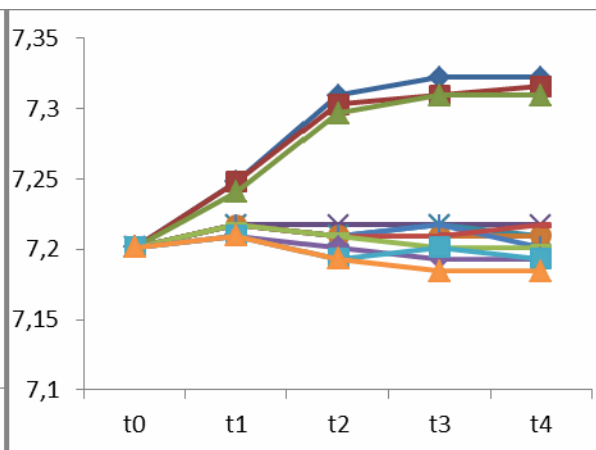
Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en absence de l'extrait phénolique



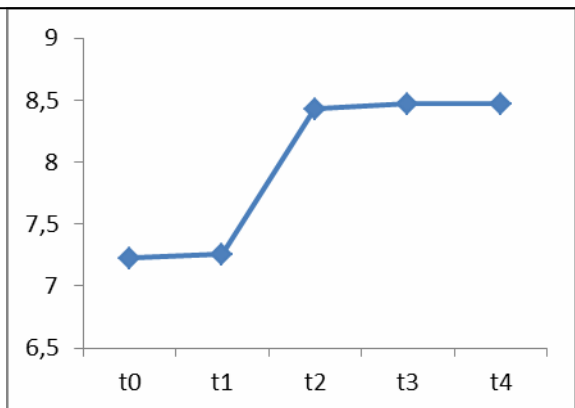
Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de l'extrait aqueux



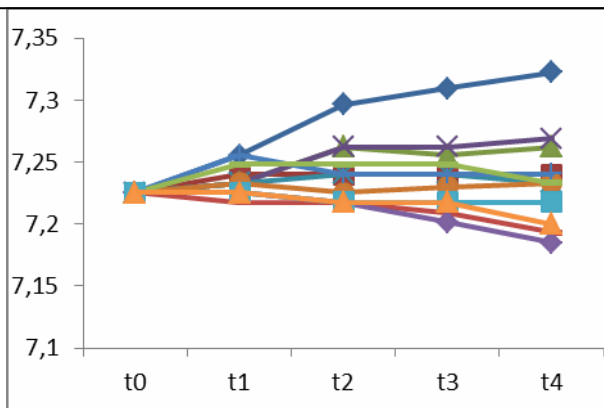
Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de l'extrait éthanolique



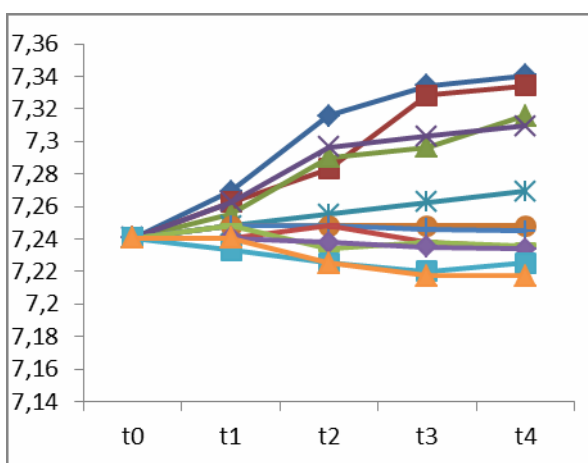
Cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de l'extrait méthanolique



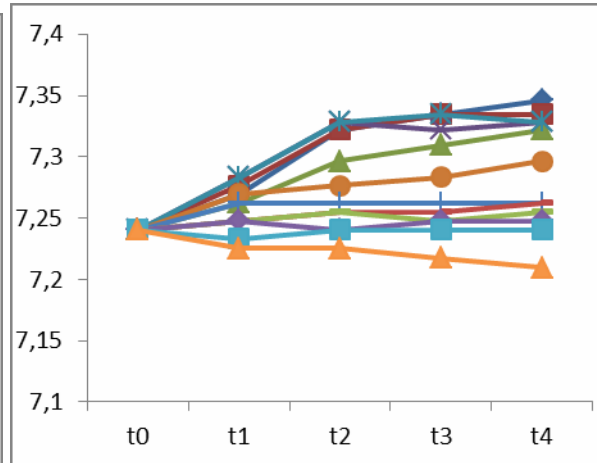
Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en absence de l'extrait phénolique



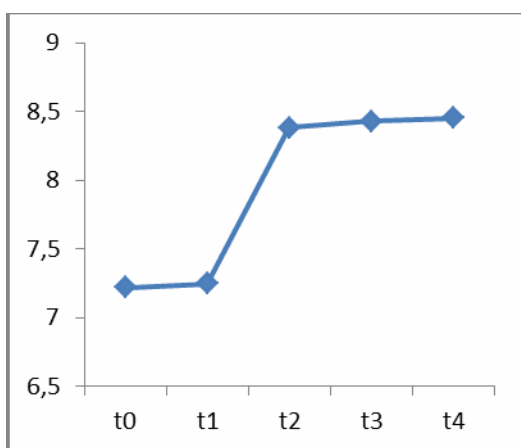
Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en présence de l'extrait aqueux



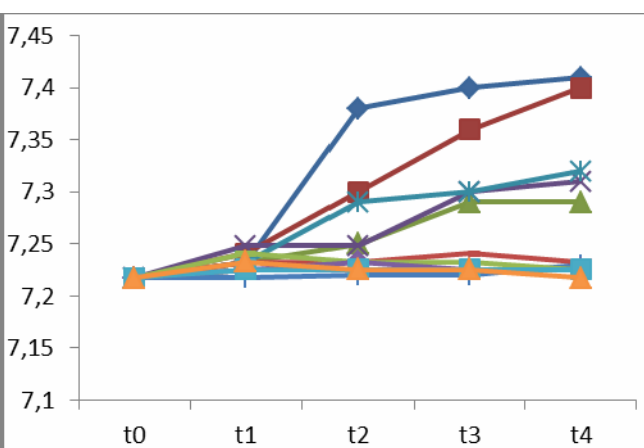
Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en présence de l'extrait éthanolique



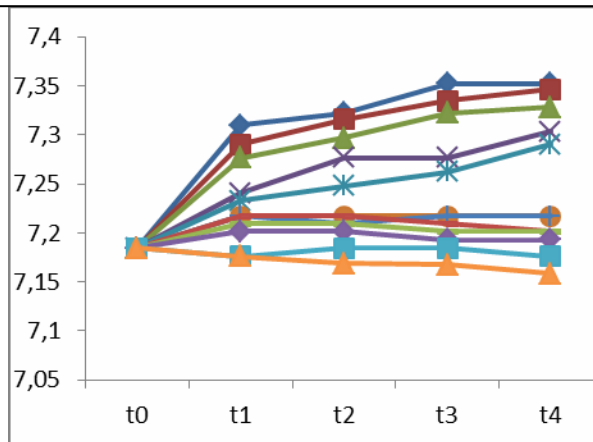
Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en présence de l'extrait méthanolique



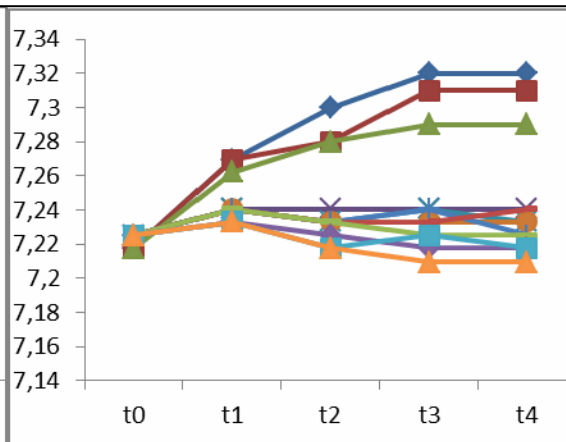
Cinétique de croissance de *Streptococcus intermedius* en absence de l'extrait phénolique



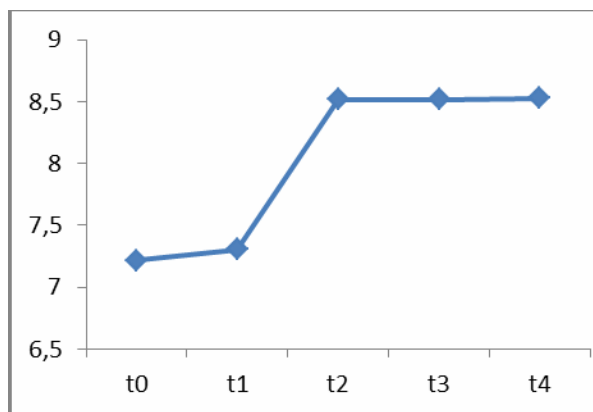
Cinétique de croissance de *Streptococcus intermedius* en présence de l'extrait aqueux



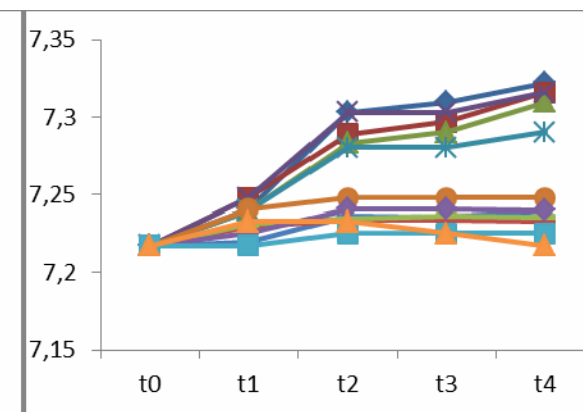
Cinétique de croissance de *Streptococcus intermedius* en présence de l'extrait éthanolique



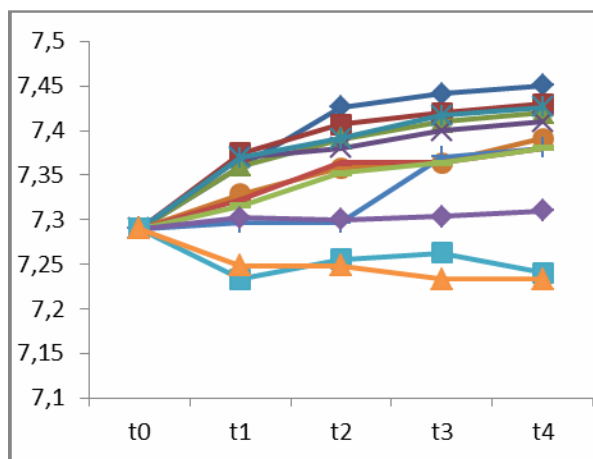
Cinétique de croissance de *Streptococcus intermedius* en présence de l'extrait méthanolique



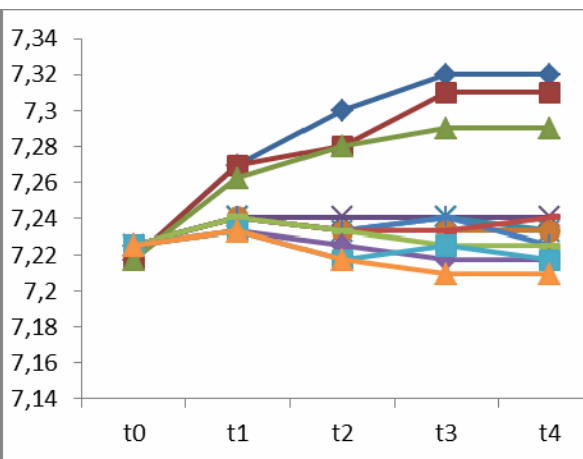
Cinétique de croissance de *Escherichia coli* en absence de l'extrait phénolique



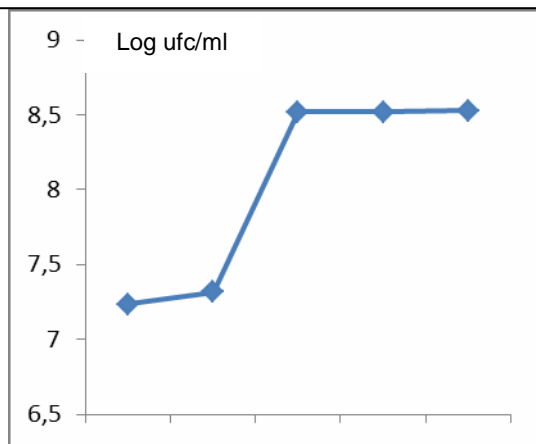
Cinétique de croissance de *Escherichia coli* en présence de l'extrait aqueux



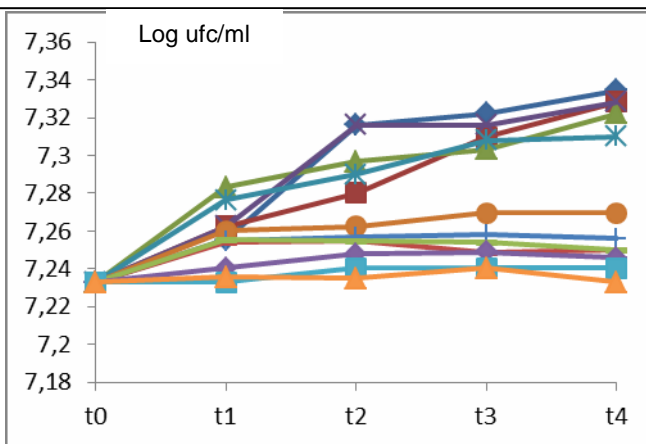
Cinétique de croissance de *Escherichia coli* en présence de l'extrait éthanolique



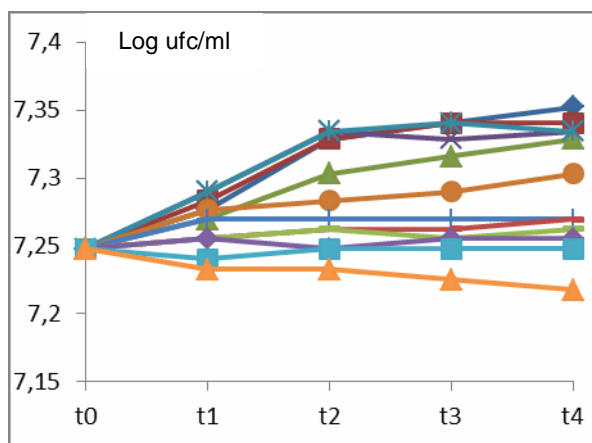
Cinétique de croissance de *Escherichia coli* en présence de l'extrait méthanolique



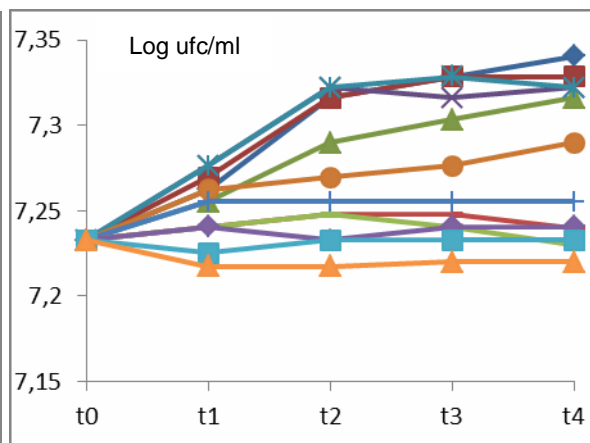
Cinétique de croissance de *Enterobacter agglomerans* en absence de l'extrait phenolique



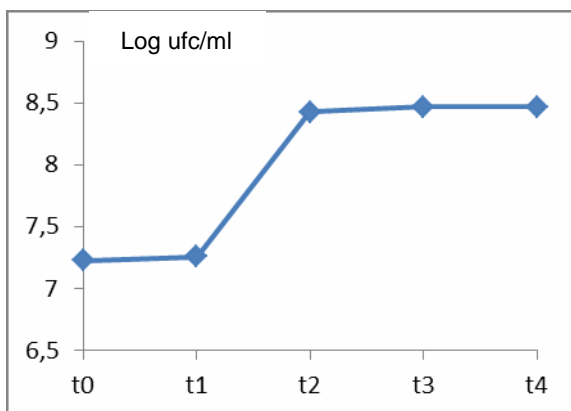
Cinétique de croissance de *Enterobacter agglomerans* en présence de l'extrait aqueux



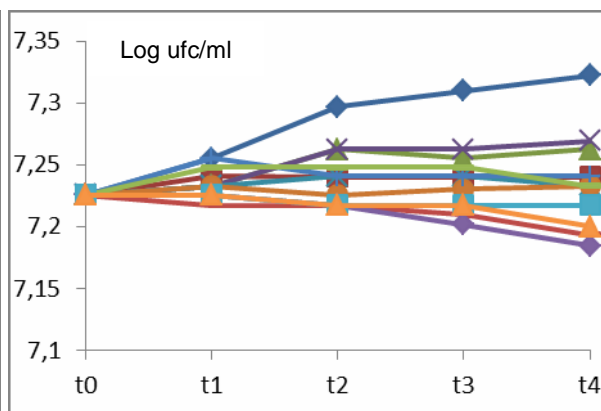
Cinétique de croissance de *Enterobacter agglomerans* en présence de l'extrait ethanolique



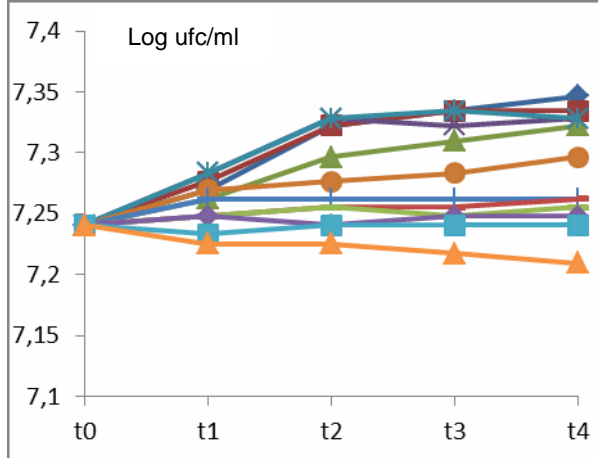
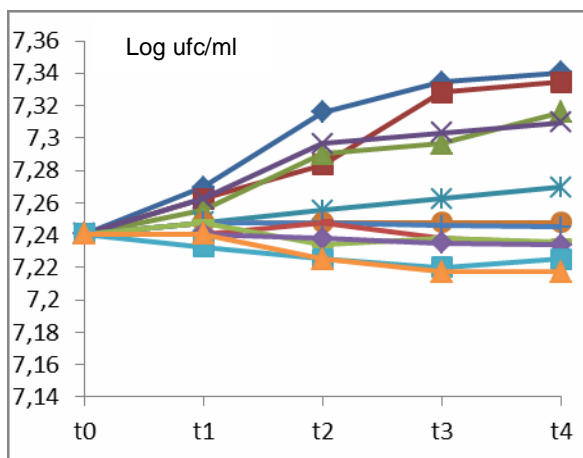
Cinétique de croissance de *Enterobacter agglomerans* en présence de l'extrait methanolique



Cinétique de croissance de *Lactobacillus* en absence de l'extrait phenolique

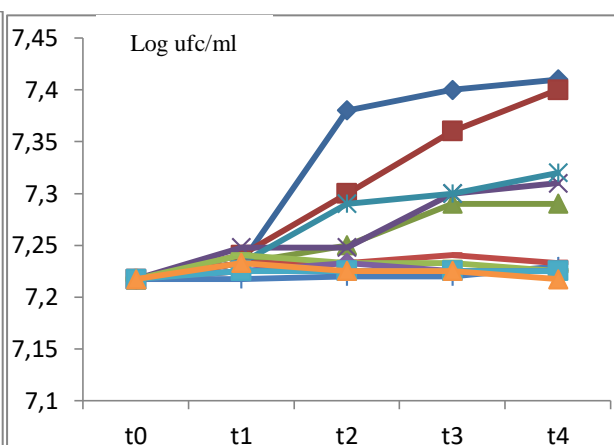
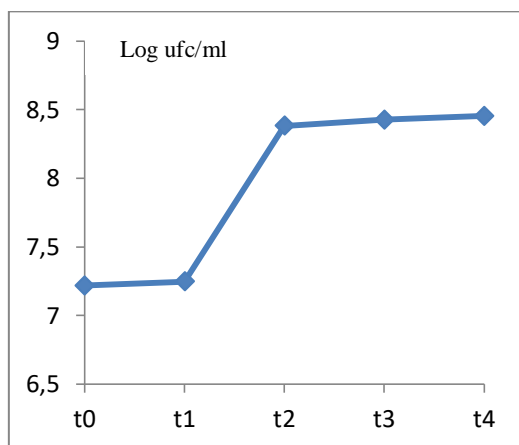


Cinétique de croissance de *Lactobacillus* en présence de l'extrait aqueux



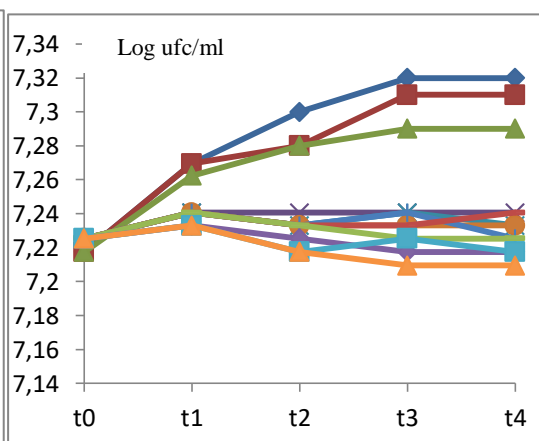
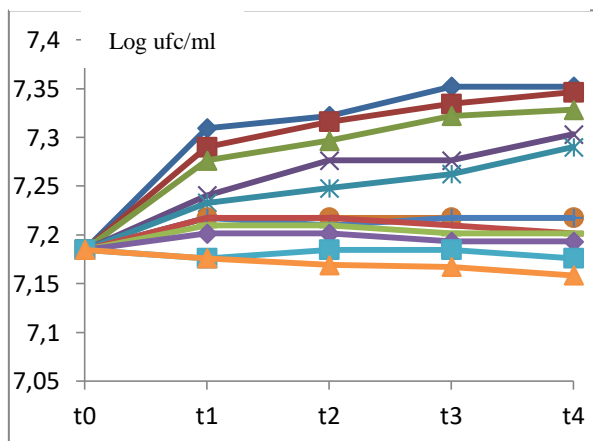
Cinétique de croissance de *Lactobacillus* en présence de l'extrait éthanolique

Cinétique de croissance de *Lactobacillus us* en présence de l'extrait méthanolique



Cinétique de croissance de *Clostridium sulfitoréducteur* en absence de l'extrait phénolique

Cinétique de croissance de *Clostridium sulfitoréducteur* en présence de l'extrait aqueux



Cinétique de croissance de *Clostridium sulfitoréducteur* en présence de l'extrait éthanolique

Cinétique de croissance de *Clostridium sulfitoréducteur* en présence de l'extrait méthanolique

Les concentration des extraits phénoliques :

- | | | | |
|---------------|---------------|---------------|-------------|
| ◆ 0.004 mg/ml | ✕ 0.03 mg/ml | ◆ 0.312 mg/ml | ◆ 2.5 mg/ml |
| ■ 0.009 mg/ml | ✱ 0.07 mg/ml | ■ 0.625 mg/ml | ■ 5 mg/ml |
| ▲ 0.01 mg/ml | ◆ 0.156 mg/ml | ▲ 1.25 mg/ml | ▲ 10 mg/ml |

Les résultats de l'évaluation des effets bactéricides des extraits phénoliques sont repris dans les tableaux suivants ou sont incluses d'une part les concentrations minimales bactéricides (mg/ml) de l'ensemble des extraits et d'autre part les valeurs du rapport entre la CMB et la CMI

Tableau 17 : Concentrations minimales bactéricides de l'extrait aqueux et rapport CMB/CMI

Souches bactériennes	l'extrait Aqueux en mg/ml			
	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
<i>Klebseila pneumoniae</i>	0.312	2.5	8	Forte inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.625	1.25	2	Inhibition modérée
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.07	0.312	2	Forte inhibition
<i>Streptococcus intermedius</i>	0.156	0.625	4	Forte inhibition
<i>Escherichia coli</i>	0.156	0.625	4	Forte inhibition
<i>Klebseila pneumoniae</i>	0.312	2.5	8	Forte inhibition
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0.625	2.5	4	Inhibition modérée
<i>Lactobacillus</i>	0.07	0.156	2	Forte inhibition
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	0.312	0.625	2	Forte inhibition

Tableau 18 : Concentrations minimales bactéricides de l'extrait ethanolique et rapport CMB/CMI

Souches bactériennes	l'extrait Ethanolique en mg/ml			
	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
<i>Klebseila pneumoniae</i>	0.312	0.625	2	Forte inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.156	0.625	4	Forte inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.156	0.312	2	Forte inhibition
<i>Streptococcus intermedius</i>	0.156	0.312	2	Forte inhibition
<i>Escherichia coli</i>	0.625	1.25	2	Inhibition modérée
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0.312	0.625	2	Forte inhibition
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0.156	0.625	4	Forte inhibition
<i>Lactobacillus</i>	0.07	0.156	2	Forte inhibition
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	0.156	0.312	2	Forte inhibition

Tableau 19 : Concentrations minimales bactéricides de l'extrait méthanolique et rapport CMB/CMI

Souches bactériennes	l'extrait Méthanolique en mg/ml			
	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
<i>Klebseila pneumoniae</i>	0.312	1.25	4	Forte Inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.07	0.156	2	Forte Inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.03	0.07	2	Forte inhibition
<i>Streptococcus intermedius</i>	0.07	0.156	2	Forte inhibition
<i>Escherichia coli</i>	0.312	1.25	4	Forte inhibition
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0.312	0.625	2	Forte inhibition
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0.07	0.156	2	Forte inhibition
<i>Lactobacillus</i>	0.03	0.07	2	Forte inhibition
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	0.07	0.156	2	Forte inhibition

Selon les tableaux précédents le rapport CMB/CMI n'excède pas 8 pour la totalité des essais, nous pouvons conclure que les bactéries testées ne présentent pas une tolérance aux extraits phénoliques *punica granatum*. Sur l'ensemble des souches, une concentration allant de 0.07 à 2.5 mg/ml est capable de tuer plus de 90% de la population bactérienne initiale. Pour l'extrait méthanolique, les CMB varient entre 0.07mg/ml contre les bactéries à Gram- (entérobactéries) et 1.25 mg/ml contre les bactéries à Gram+.

Cette sensibilité accrue est confirmée par les valeurs de la CMB qui sont plus proches de celles des CMI pour tous les extraits. D'après Canillac et Mourey (2001), lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4, l'agent antibactérien est considéré comme bactéricide. Nous constatons que l'action de l'extrait méthanolique de *punica granatum* est bactéricidique. Cependant, pour l'extrait aqueux l'action varie selon le germe.

Vue les résultats phytochimiques qualitatifs et quantitatifs de les extraits phénoliques de *punica granatum* trouvés auparavant et la présence des tanins galiques dans ces extraits qui se lient à des protéines riches en proline et qui peuvent interférer avec la synthèse des protéines des parois bactériennes, ceci est proposé comme un mécanisme expliquant l'effet antibactérien de cet extrait Shimada *et al* (2006), Les flavonoïdes réagissent aussi et peuvent former des complexes avec des protéines solubles et des parois cellulaires des bactéries, les saponines présents aussi exercent un effet antibactérien qui peut être attribué à sa capacité à provoquer une fuite de protéines ainsi que certains enzymes de la cellule

Dans l'ensemble l'action inhibitrice est remarquée chez les bactéries à Gram + que celles à Gram -. Les différences de sensibilité des bactéries à Gram-négatif et des bactéries Gram+ positif indiquées par la présence des substances antimicrobiennes vu à être liés à la structure et la composition de leurs parois cellulaires. En effet les bactéries Gram positif ont une couche externe plus perméable riche aux peptidoglycane alors que les bactéries à Gram- négatif ont une barrière extérieure plus rigide phospholipides .

Les résultats de l'activité antibactérienne ont révélé l'efficacité de tous les extraits contre l'ensemble des souches testées. L'activité antibactériennes des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, y compris les flavonoïdes et les tannins ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupe hydroxyle libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs .

La richesse de *punica granatum* en tannins (Gil et al.,2000) et selon Cowan (1999) à suggérer que les propriétés antimicrobiennes des tanins pourraient être liées à leur capacité à inactiver l'adhérence microbienne ,la synthèse de certains enzymes et protéines membranaires de microorganismes par le complexe avec les polysaccharides, leur capacité de ce fixer a des substrats tel que les sels minéraux, vitamines et glucides ce qui les rende indisponibles pour les microorganismes et leur capacité à modifier la morphologie des microorganismes.

D'autre part, étant donné que les fractions de grenades contiennent un large éventail de flavonoïdes en particulier les anthocyanes (Seeram et al., 2006) pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont des puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase .

Autre part, le mécanisme de perturbation de croissance est expliqué par l'action des composés phénoliques sur la membrane. Ces extraits vont entrainer une perte de la perméabilité sélective de la membrane cellulaire par changement de ces propriétés physiques.

D'après Wang et al(2006), Le résultat suggéré que la conjugaison de composées phénolique et les protéines dans le microorganisme, en particulier l'enzyme clé peut être la voie principale pour inhiber la croissance de micro-organisme.

En résumant les mécanismes d'effet antimicrobien des polyphénols

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe, peut impliquer multiples modes d'actions. Parmi les hypothèses avancées, on peut citer :

1. L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiens.
2. La séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
3. L'inhibition de métabolisme microbien (Milane, 2004)
4. Dégradation de la paroi cellulaire microbienne
5. Perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite de composants cellulaires.
6. L'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN ,des protéines, des lipides et la fonction mitochondriale. Exemple, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont des puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase
7. Formation des complexes avec la paroi.

Ces mécanismes ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être comme conséquence d'un autre mécanisme. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organisme et à l'arrangement de la membrane externe .

Les différences trouvées peuvent être attribuées aux plusieurs facteurs tels que les facteurs inhérents (variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières), les méthodes d'extraction, préparation de l'extrait, le solvant utilisé, la sensibilité des bactéries, et finalement l'organe de la plante utilisé (Zhang *et al.*, 2009).

II.6. Etude *in vivo*

II.6.1. Etude de la toxicité aigue

L'évaluation de la toxicité aiguë consiste à mesurer et enregistrer les différents effets adverses de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* qui sont, immédiatement, apparus après l'administration d'une seule dose de la substance testée (Leblanc, 2010).

II.6.1.1. Suivi de mortalité des rats

L'étude de la toxicité générale aiguë de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* est primordiale pour déterminer leur innocuité pour leur usage sans risque d'intoxication. Les résultats qui suivent (tableau 19), montrent le nombre de mortalité enregistrés durant les 72 heures qui suivent l'administration des différentes doses de l'extrait phénolique

Le premier rat mort à la dose de 4000mg/kg de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* après presque 3 jours suivant le gavage suite à des signes compliqués d'intoxication. En premier jour, la rate a montré une respiration difficile, une perte de locomotivité, des contractions musculaires lors du troisième jour, elle meure après s'être allongée sur le ventre, alors que les derniers rats qui ont survécu jusqu'au 15^{ème} jours sont des rats qui ont reçu des doses inférieures à 4000 mg/Kg. Après avoir calculé les pourcentages de mortalité dans chaque lot, la méthode de Dragstedt et Lang a permis de révéler une DL₅₀ pour l'extrait méthanolique de *punica granatum* qui est de 6000 mg/kg

Dans la présente étude la DL₅₀ de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* calculée est de 6000 mg/kg. On en conclut que l'extrait méthanolique de *punica granatum* est considéré selon la classification de Diezi (1989) comme étant faiblement toxique chez les rats par voie orale et par conséquent cette plante mérite d'être utilisée avec précaution chez l'homme.

Une étude réalisée par Belkacem N (2009) ou la DL50 enregistrée par voie orale de l'extrait phénolique de *punica granatum* est de 4000g/Kg de poids corporel. ceci implique le stade de récolte, facteurs environnementaux et la composition d'extrait.

II.6.1.2. Suivi du comportement des rats

Après l'administration de l'extrait phénolique par voie orale, une augmentation régulière des signes d'intoxications en liaison avec la dose injectée a été remarquée. Les signes sont résumés dans le tableau 20.

Les signes commencent à augmenter à partir de la dose 2000mg/kg . Les rats, à cette dose, montrent des signes de faiblesse associés à l'isolement individuel. Leurs mouvements et leurs appétits diminuent et la respiration devient difficile.

A la dose 6000mg/kg de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* la respiration deviennent laborieuse, les rats montrent des signes encore plus forts d'intoxication, leur rythme cardiaque s'accélère et après un quart d'heure, les rats commencent à souffrir des convulsions, des troubles involontaires de mouvements ce qui les conduisent à une démarche chancelante, certaines guérissent de ces troubles et d'autres finissent par mourir suite à des contractions musculaires.

Tableau 20 :L'effet toxique de l'extrait méthanolique sur le comportement des rats traités oralement

Dose (mg/kg)	Signes de toxicité	Morts
500	Normal	00
1000	Normal	00
2000	Normal	00
4000	Hypoactivité, isolement, redressement des poils	00
6000	Somnolence, hypoactivité, isolement, redressement des poils, bradycardie difficulté de respiration, des tremblements légers du corps et dyspnée.	2 après 24 h 01 près 48 h

II.6.I.3. Suivi du Poids corporel

Le suivi de la variation de la masse corporelle des rats au cours de l'expérience de la toxicité aiguë par l'extrait phénolique de *Punica granatum* a indiqué qu'il y a une diminution du poids tout au long des 15 jours comparativement au témoin (figures 38).

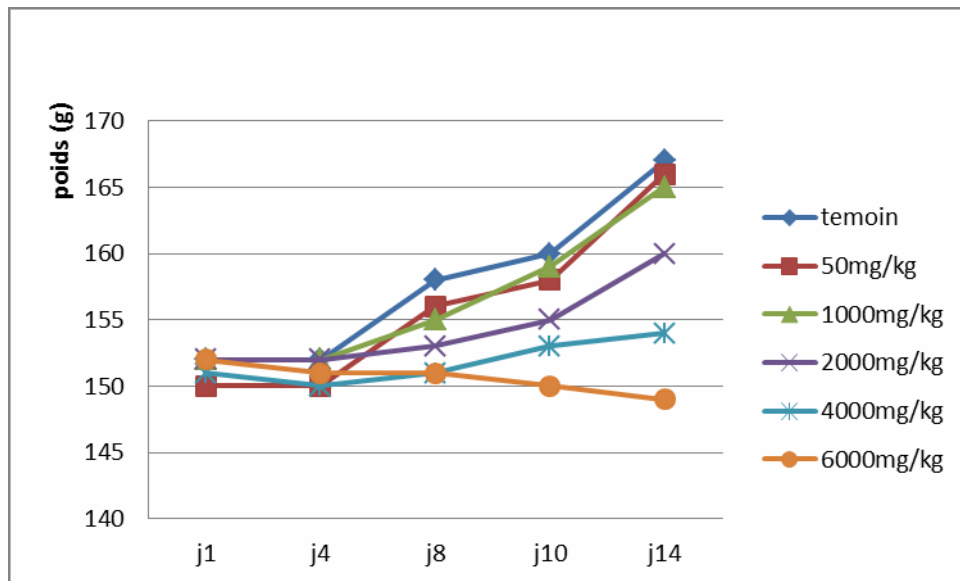


Figure 38 : Evolution du poids corporel des rats traités avec l'extrait phénolique de *punica granatum*

En analysant ces résultats, et en comparant avec les témoins, on remarque une diminution du poids corporel. toutefois la diminution est plus élevée pour les rats recevant 6000mg/kg de l'extrait méthanolique, la récupération du poids initial est remarquée dans la deuxième semaine d'expérimentation néanmoins pour les doses supérieures 6000 mg/kg, la récupération est irréversible, ceci est confirmé par les symptômes enregistrés auparavant.

Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques Hilaly *et al.*, (2004). La diminution du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal. Cette réduction du poids peut être expliquée par une réduction de la consommation des aliments, mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée.

II.6.2. Résultats de l'activité anti-infectieuse *in vivo*

II.6.2.1. Evolution des signes cliniques

Le taux de mortalité et les manifestations pathologiques observées se différencient entre les différents lots. cette mortalité est forcément due au rat lui-même qui n'a pas pu supporter cette dose bactérienne étrangère, car selon Backman *et al.*, (1997) une dose de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml est susceptible de provoquer une infection intestinale chez le rat.

Il est aussi à préciser qu'aucun groupe de rat n'a souffert de diarrhée sanglante. Cependant 100% des rats infectés non traités, 60% des rats infectés traités et 20% des rats traités non infectés manifestaient respectivement du symptôme de diarrhée aqueuse un jour après l'infection par *Bacillus cereus*, ce symptôme diarrhéique est typique suite à une infection de ce genre (Griess, 2013). Il est lié à l'élaboration par la souche bactérienne d'une entérotoxine thermolabile, produite *in vivo* dans l'intestin grêle, et synthétisée au cours de la phase exponentielle de croissance bactérienne à une température comprise entre 32 et 37°C (Teyssou *et al.*, 1998).

Il a été observé qu'il y avait plus de réduction du nombre de rats qui déféquaient les selles liquides sur le temps surtout pour le lot traité. Ainsi, la défécation de diarrhée aqueuse par les rats a duré entre quelques heures suivant l'induction de l'infection à 1 jour dans le groupe traité. Pour les autres, la diarrhée persistait jusqu'au quatrième jour surtout pour les rats infectés non traités (lot D), Dans ce dernier groupe; les rats ont souffert d'une diarrhée abondante provoquant peu la faiblesse avec diminution de l'activité, perte d'appétit et la perte de poids ce qui concorde avec les symptômes s'associant à une diarrhée chronique (Tams, 1986).

Alors qu'aucun changement pathologique n'a été observé dans d'autres lots des rats pendant toute la durée de l'expérimentation. Globalement, les rats traités par l'extrait phénolique de *Punica granatum* ont été protégés contre la diarrhée qui est habituellement induite par l'infection de *B. cereus*. Ce qui indique que ces extraits phénoliques bloquent l'accumulation de liquide dans la paroi intestinale des rats. Cet effet est dû à la composition chimique de l'extrait lui-même qui est doté d'un pouvoir anti-diarrhéique (Itelima et Agina, 2014). En effet quelques rapports antérieurs ont démontré l'activité antidiarrhéique des tanins Mukherjee *et al.*, (1998), flavonoïdes (Galvez *et al.*, 1993), des alcaloïdes (Gricilda et Molly, 2001), des saponines, des stérols, et des terpènes Otshudi (2000), en effet les analyses phytochimiques préliminaires des extraits de plantes de *punica granatum* ont montré la présence de tous ces composés.

II.6.2.2. Evolution pondérale

Le suivi de la variation de la masse corporelle des rats au cours de l'expérimentation, ainsi que le gain ou la perte de poids de ces derniers sont résumés dans la figure 39.

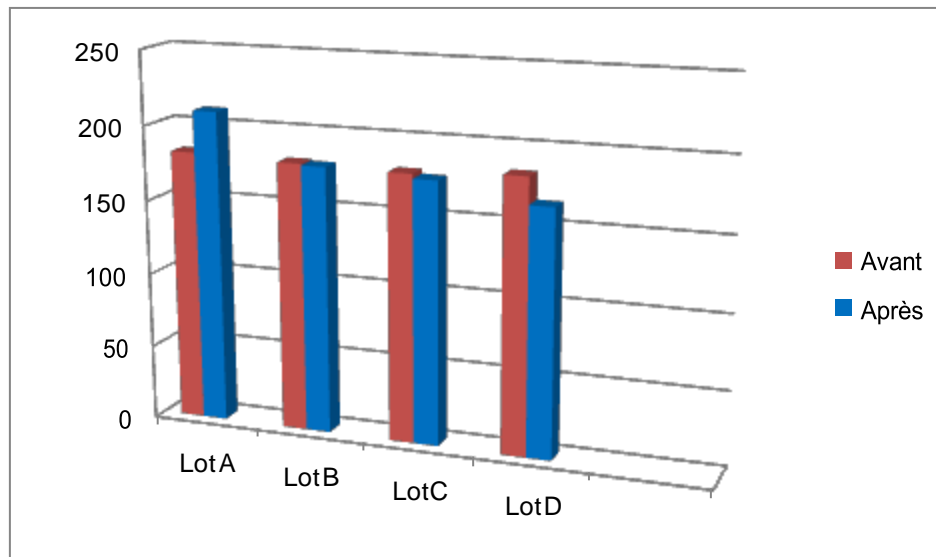


Figure 39 : Poids corporels enregistrés avant et après l’expérience.

II.6.2.3. Evolution pondérale chez les rats

Chez Les rats recevant de l’eau physiologique (lot A), le poids ainsi que l’apport en nutriments évoluaient de façon normale enregistrant un gain de 27,46 g. En revanche, une perte massive et significative du poids a été déterminée chez les rats infectés non traités (lot D) avec (-43,75g). Une légère diminution de la masse corporelle a été remarquée chez les groupes recevant l’extrait méthanolique de *punica granatum*.

Le changement du poids est utilisé comme un indicateur général des effets indésirables des composés chimiques (El Hilaly *et al.*, 2004). Ainsi, la perte du poids est corrélée à l’état physiologique de l’animal et peut être expliquée par l’altération de son métabolisme (Mukinda et Syce, 2007). C’est le cas des rats infectés non traités, dont la perte de leur poids est probablement due à l’infection causée par *Bacillus cereus*. (Hamza, 2011) a pu constater aussi l’effet rapide des extraits polyphénoliques sur la prise alimentaire.

En contrepartie, l’évolution normale de la masse corporelle des rats infectés ayant reçus l’extrait phénolique de *Punica granatum* testé témoigne la capacité de ces substances à maintenir constant le poids des rats. Cette capacité peut être corrélée à l’atténuation de l’infection à l’origine du déséquilibre de l’état physiologique des rats malades (McCarthy *et al.*, 1985).

II.6.3. Détection de *B. cereus*

La recherche du germe pathogène *B. cereus* a été effectuée dans les selles des animaux avant l'expérimentation et aucun rat n'est révélé porteur. Le pourcentage de rats wistar qui excrètent *B. cereus* dans les matières fécales après induction de l'infection et le traitement par des agents antimicrobiens a été présenté à la figure 40.

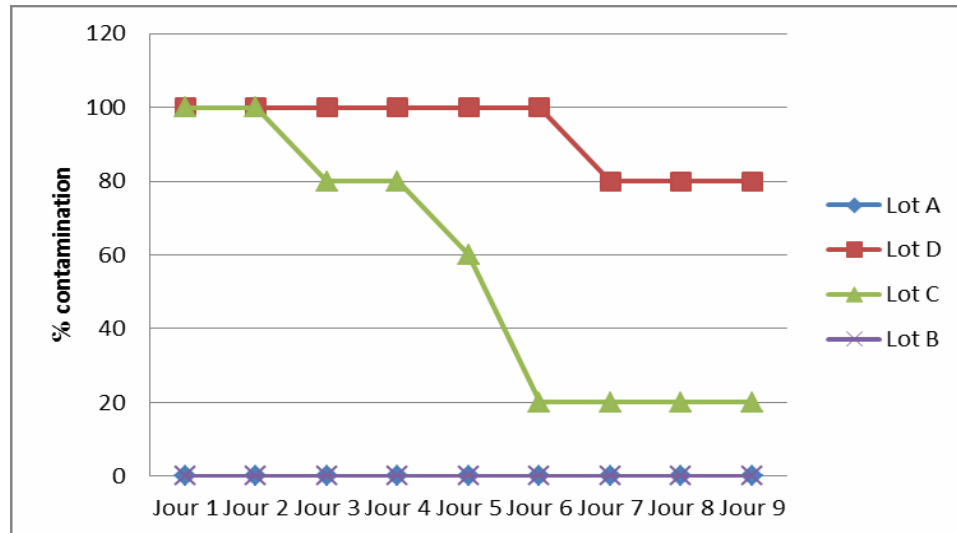


Figure 40 :% des rats porteurs de *B. cereus* dans leurs matières fécales.

Selon les résultats, on remarque que le pourcentage des rats contaminés par *Bacillus cereus* après inoculation était très variable entre les rats, ce qui est en accord avec des études de nombreux auteurs (Cray et Moon, 1995 ; Hermon *et al.*, 1999 ; Itelima et Agina, 2014).

Le nombre des rats excréant *Bacillus cereus* était plus élevé dans le lot D car la quasi-totalité des rats infectés non traités témoignaient la présence de ce germe dans leurs selles, pendant les six jours qui ont suivi l'induction de l'infection pour atteindre 80% à la fin de l'expérience. Conformément à nos observations, d'autres études ont montré que les spores de *Bacillus sp.* sont capables de persister et parfois de germer dans le tractus intestinal. Trois souches de *B. cereus* ont montré cette persistance dans le tractus gastro-intestinal de la souris jusqu'à 18 jours de post-administration (Duc *et al.*, 2004). Une étude plus poussée chez les animaux a montré que le nombre de spores de *B. cereus* excrété dans les fèces de souris dans certains cas, étaient plus élevés que l'inoculum original (Hoa *et al.*, 2001). Avec la présente étude, et à la lumière des travaux antérieures, nous constatons que les spores germent occasionnellement dans l'intestin grêle riche en éléments nutritifs, et la formation de spores subséquentes peut être une bonne stratégie pour survivre dans l'environnement plus hostile et en éléments nutritifs rares du grand intestin (Wilcks *et al.*, 2006).

Comme une récente étude montre que les cellules végétatives de *Bacillus sp.* sont sensibles au fluide gastrique simulé avec un pH inférieur à 4,5 (Clavel *et al.*, 2004), tandis que les spores de la même souche sont résistants à un pH de 1,5 pendant plusieurs heures.

Cette résistance peut être expliquée par le fait que la surface est recouverte d'appendices qui peuvent permettre des spores du germe pathogène d'adhérer à la surface de l'épithélium (Husmark et Ronner, 1992). ceci élucide le déversement continu de *B. cereus* dans le groupe infecté non traité tout au long de l'expérience.

En revanche, pour le lots traité par l'extrait méthanolique de *punica granatum* dans cette étude supportaient mieux l'infection par ce qu'il présente une activité antibactérienne significative contre *Bacillus cereus* inoculées dans les rats en réduisant la concentration du germe dans leurs matières fécales à des niveaux indétectables après l'inoculation.

En général, l'extrait phénolique de *punica granatum* présentait un effet antimicrobien vis-à-vis de cette infection, ce qui a été confirmé par les résultats trouvés *in vitro*.

II.6.4. Poids relatif des organes

A la fin du traitement, tous les rats ont été sacrifiés et les organes (foie, rate, reins, poumons et cœur) ont été prélevés, observés et pesés.

Les valeurs des masses relatives des organes internes prélevés des différents groupes de rats sont élucidées dans la figure 41.

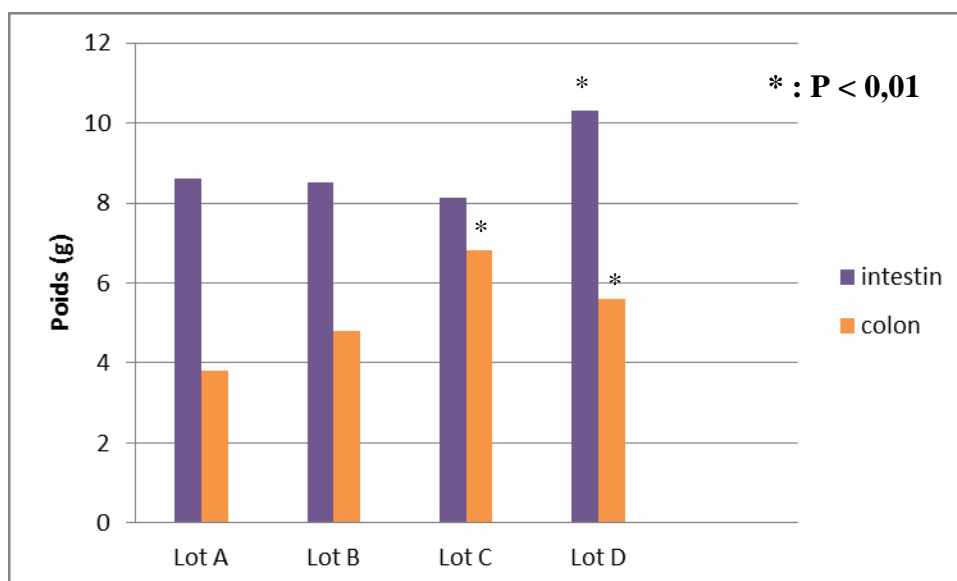


Figure 41 : Le poids de l'intestin et le colon prélevés lors de sacrifices des rats des différents lots « A, B, C et D »

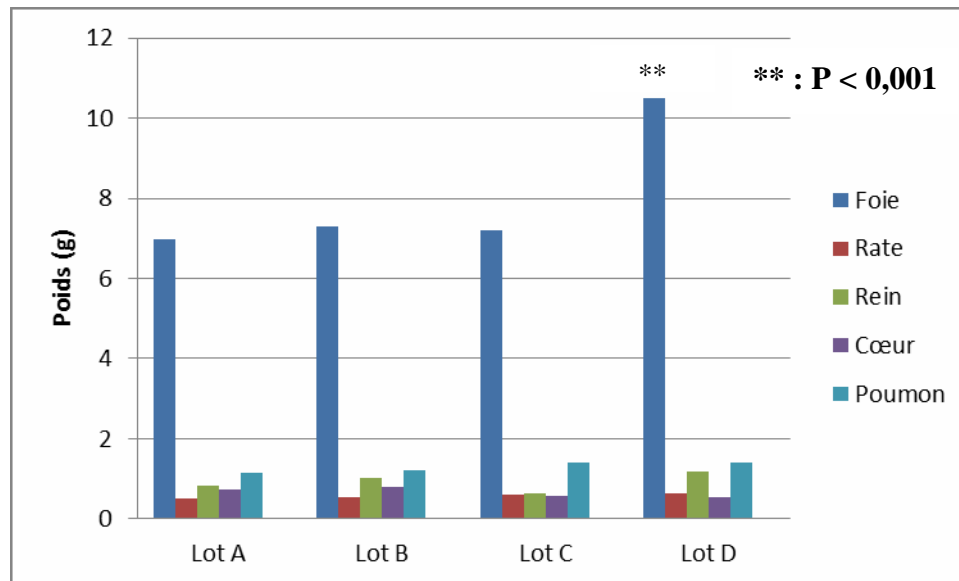


Figure 42 : Le poids des organes prélevés lors de sacrifices des rats des différents lots « **A, B, C et D** »

De nombreuses études ont montré que, dans le cas d'une infection bactérienne voir intestinale, non seulement les intestins sont touchés, les organes viscéraux peuvent également être affectés par le processus pathologique (Schmidt *et al.*, 2011).

Chez les rats infectés non traités, on remarque une augmentation hautement significative des poids des foies, rates, reins cœurs et les intestins par rapport aux témoins ce qu'on appelle phénomène d'hypertrophie, ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux trouvé par Lima *et al.*, (2015) suite à une infection intestinale par *Schistosoma mansoni* sur des souris. Ce qui peut être dû à l'effet des endotoxines produites par le germe pathogène *Bacillus cereus* , en effet Jothy *et al.*, (2011) ont trouvé que les altérations de la masse relative des organes reflètent la toxicité après l'exposition à une substance toxique, le cœur, le foie, les reins, la rate et les intestins sont les premiers organes affectés par la réaction métabolique provoquée par le toxique .

A l'exception d'une augmentation de la masse relative des reins des rats traités avec l'extrait phénolique de *punica granatum* toutes les autres valeurs sont semblables à celles obtenues chez les rats sains

les valeurs que nous avons obtenues indiquent un effet bénéfique de l'extrait testé sur les organes internes, ceci pourrait donc compléter celui de l'étude de la toxicité aigüe des extraits car d'après Teo *et al.*, (2002), la variation du poids des organes internes serait un bon indice de l'évaluation de la toxicité d'une substance.

II.6.5. Evaluation de la translocation bactérienne

II.6.5.1. Détection de *B. cereus* dans les différents organes de translocation

La recherche du germe pathogène *Bacillus cereus* suite à l'infection, dans les organes internes était indispensable pour déceler d'éventuelles translocations bactériennes, les résultats trouvés sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 21: Détection de *Bacillus cereus* dans les organes internes

Organes Lots	Sang	Foie	Rate	Poumons	Reins	Cœur		Colon	Intestin
Lot A	-	-	-	-	-	-		-	-
Lot B	-	-	-	-	-	-		-	-
Lot C	-	-	-	-	-	-		-	+
Lot D	++	++	++	++	++	++		++	++

(-) : Absence d. *cereus*, (+): Présence de *B. cereus*

Ce qui a été remarqué en premier lieu est la propagation de *Bacillus cereus* dans les différents organes de l'ensemble des rats infectés non traités, l'atteinte intestinale est associée parfois à des translocations et à des bactériémies (Merret *et al.*, 1994 ; Horgan *et al.*, 1994) ainsi la translocation bactérienne de ce germe a été dû à l'altération de la muqueuse intestinale (Plantefève et Bleichner, 2001). Pour le lot C, une absence du germe est mentionnée dans la majorité des organes, ce qui prouve son élimination par l'extraits phénolique de *punica granatum*, sauf pour les l'intestin seulement ce qui confirme les résultats retrouvés lors de la détection de ce germe dans la matière fécale des rats.

De plus la persistance du germe dans le colon indique qu'il n'est pas sous forme de cellules végétatives mais plutôt de spores qui ont germé à chaque fois les conditions redeviennent favorables car seulement ces derniers peuvent résister à l'acidité du fluide gastrique de l'appareil digestif avec un pH de 1,5 tout au long de l'expérimentation (Clavel *et al.*, 2004). Si les spores avaient traversé le tractus intestinal sous forme d'objets inertes, non soumis à la germination et à la prolifération, il est prévu qu'ils étaient complètement éliminé de l'intestin après environ 6 jours (Mather *et al.*, 1997). Les spores de *Bacillus cereus* sont plus hydrophobe que d'autres spores de *Bacillus* (Ronner *et al.*, 1990; Andersson *et al.*, 1998), et que la surface des spores est recouverte avec des appendices (Husmark & Ronner, 1992).

Ceci peut activer les spores de *Bacillus cereus* à adhérer à la surface de l'épithélium, expliquant ainsi la présence de *Bacillus cereus* tout au long de l'expérimentation dans la majorité des rats traités.

D'une façon globale, les résultats montrent une absence totale de translocation bactérienne dans les différents lots traités curativement. L'infection par voie orale des rats se manifeste alors, après une incubation, par une hyperthermie, une diarrhée, perte de poids, une anémie hémolytique, une excrétion fécale de *Bacillus cereus* et des perturbations de la flore intestinale.

Après une phase de colonisation, *Bacillus cereus* se multiplie dans le tube digestif. Elle franchisse la barrière intestinale essentiellement au niveau de l'iléon. Différents types cellulaires sont envahis : les entérocytes et en particulier les cellules M des plaques de Peyer. L'adhésion et l'invasion sont deux étapes indépendantes. (Flandrois ,2002).

- **Phase d'adhésion**

Le mécanisme de l'adhésion est encore mal connu. Les pili joueraient un rôle dans l'attachement bactérien. Les chaînes latérales du LPS intervenaient dans l'adhésion et la formation du complexe bactérie-cellule hôte lors de l'invasion. Les flagelles, et la mobilité bactérienne qui résulte de leur action, accroîtraient les capacités adhésives.

- **Invasion des entérocytes**

Cette phase, cliniquement silencieuse, commence quinze minutes après l'infection: c'est le temps nécessaire pour que les bacilles sécrètent les molécules impliquées dans l'invasion .Elle débute par un effacement des microvillosités, une ondulation de la membrane plasmique de la cellule hôte, la formation d'une vacuole et un réarrangement du cytosquelette (accumulation d'actine). Le réarrangement du cytosquelette de la cellule hôte est induit par des protéines bactériennes codées par les gènes sipA, sopB et sopE. Ces protéines modifient la concentration intracellulaire en inositol phosphates. Après endocytose, la bactérie migre au sein d'une vacuole phagocytaire au travers de la cellule et réapparaît sur la face basolatérale.

Toutefois, certaines bactéries semblent utiliser la voie paracellulaire avec ouverture transitoire des jonctions serrées. Les mécanismes d'invasion épithéliales ont complexes et résultent d'un dialogue» entre la bactérie et la cellule hôte au cours du quels ont échangés divers signaux biochimiques

Les bacilles sécrètent un ensemble de molécules grâce à un système particule appelé TTSS (Type III Secretion System) et sont codées par des gènes spécifiques. Pas moins de 33 protéines sont codées par les gènes du TTSS. Certaines protéines, les «invasives», sécrétées par la bactérie se fixeraient à des récepteurs spécifiques des cellules M et faciliteraient l'invasion de ces cellules. (Nauciel, 2000).

L'invasion de l'épithélium nécessite l'expression de gènes spécifiques: au moins 18 gènes chromosomiques semblent nécessaires pour l'invasion épithéliale. Le principal responsable est le locus *inv* composé de quatre gènes. La plupart des autres gènes sont des gènes de régulation: *csr*, *spi*... L'ensemble de ces gènes code pour les protéines *Sop* qui apparaissent comme essentielles à l'internalisation des bactéries. Les conditions environnementales telles que l'anaérobiose et l'osmolarité élevée augmentent significativement le niveau d'expression du phénotype invasif: les bacilles répondent aux conditions prévalant au sein de la lumière intestinale. Après avoir franchi la barrière épithéliale, les salmonelles sont phagocytées par les macrophages de la lamina propria en contact avec les cellules M des plaques de Peyer.

Les bactéries sont transportées jusqu'aux nœuds lymphatiques. Les cellules dendritiques transporteraient également les salmonelles jusqu'à ces nœuds lymphatiques. Leur dissémination peut s'arrêter là avec destruction de la bactérie. Inversement, les bacilles peuvent gagner, via le système réticulo endothélial, le foie et la rate où elles se multiplient. Elles peuvent alors envahir l'ensemble des organes après une phase bactériémique. (Avril, 1997).

Les phénomènes inflammatoires peuvent être particulièrement sévères dans certains cas comme le prouvent, les lésions observées à l'autopsie. Ces lésions semblent liées au caractère invasif des bactéries et au recrutement dans la paroi intestinale de cellules inflammatoires (Leyral, 1996). L'accumulation de fluides dans la lumière intestinale lors d'infection semble liée à la réponse inflammatoire. Les prostaglandines produites au cours de la réaction inflammatoire stimuleraient l'adénylcyclase entérocytaire provoquant ainsi une sécrétion d'électrolytes et d'eau. Il semblerait également que l'entrée des bacilles dans les entérocytes provoque la libération de chémokines et de cytokines par ces cellules intestinales. Les chémokines induisent alors la prolifération des polynucléaires neutrophiles vers les sites infectieux.

Cet afflux de polynucléaire s'est associé à une expression croissante d'IL-8, GRO (Growth Related Onchogene), GCP2 (Granulocyte Chemotactic Protein 2), IL1etIL4, certains glycomacropéptides supprimeraient la production d'interleukines IL8 et deviendraient ainsi des molécules prometteuses pour la prévention des infections intestinales.

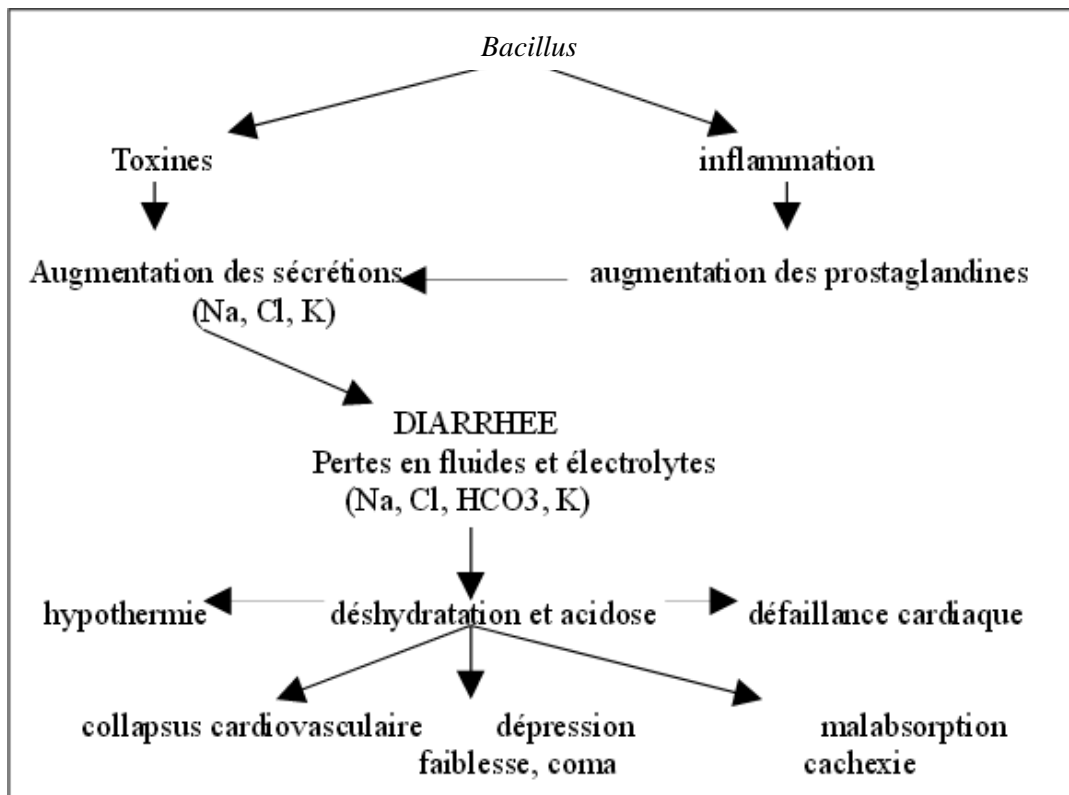


Figure 43: la pathogénicité de *Bacillus cereus*

II.6.5.2. Etude de la translocation bactérienne de flore résidante et transitoire du tube digestif

L'ensemble des résultats de dénombrement des germes résidents dans le tube digestif, le sang et les organes internes chez les rats avec ou sans traitement par l'extrait phénolique sont illustrés dans les figures qui suivent :

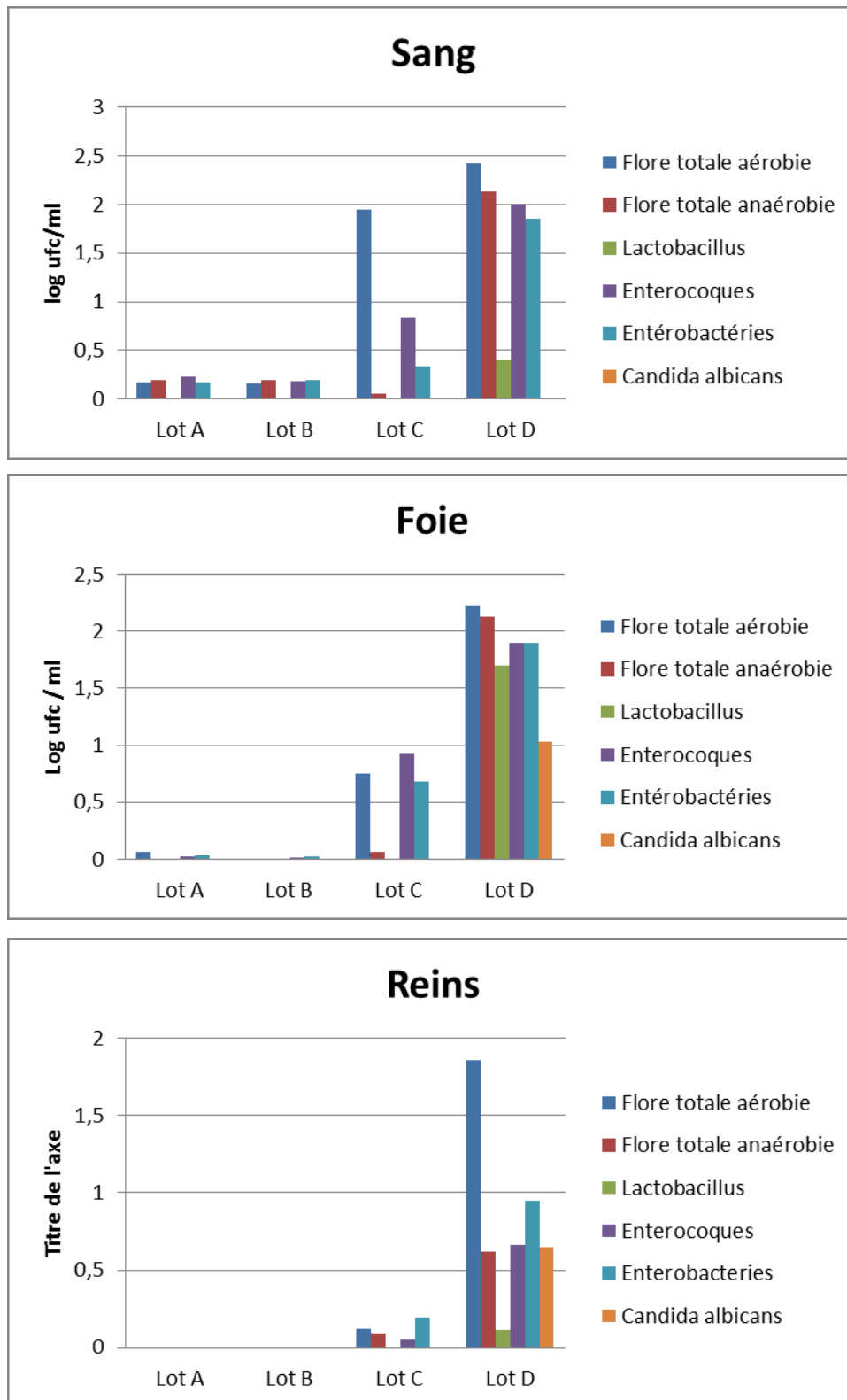


Figure 44 : Translocation bactérienne de la flore intestinale au niveau du sang, foie et les reins chez les quatre lots de rats **p<0.001. ***p<0.0001

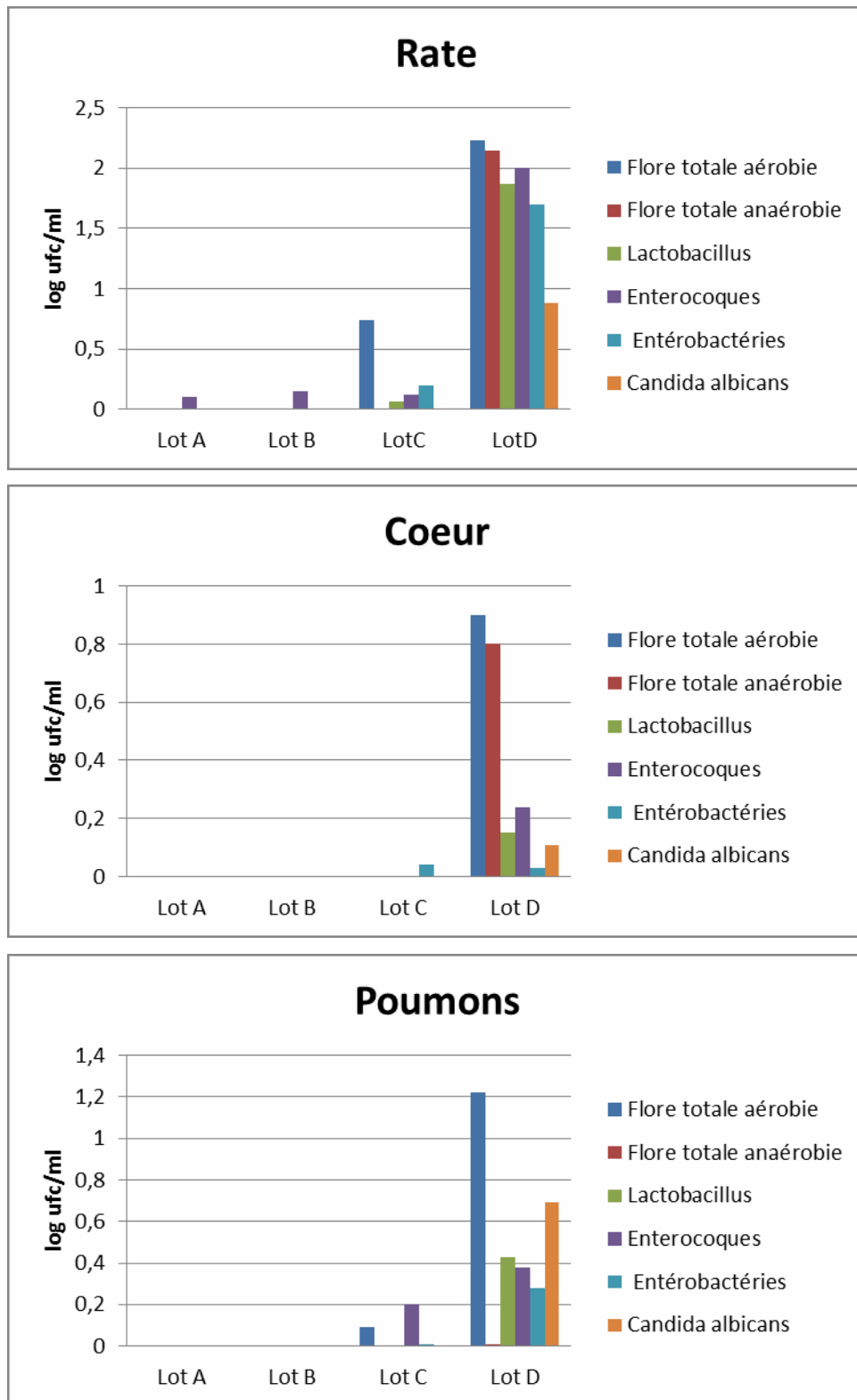


Figure 45 : Translocation bactérienne de la flore intestinale au niveau de la rate .cœur et poumons chez les quatre lots de rats **p<0.001, ***p<0.0001

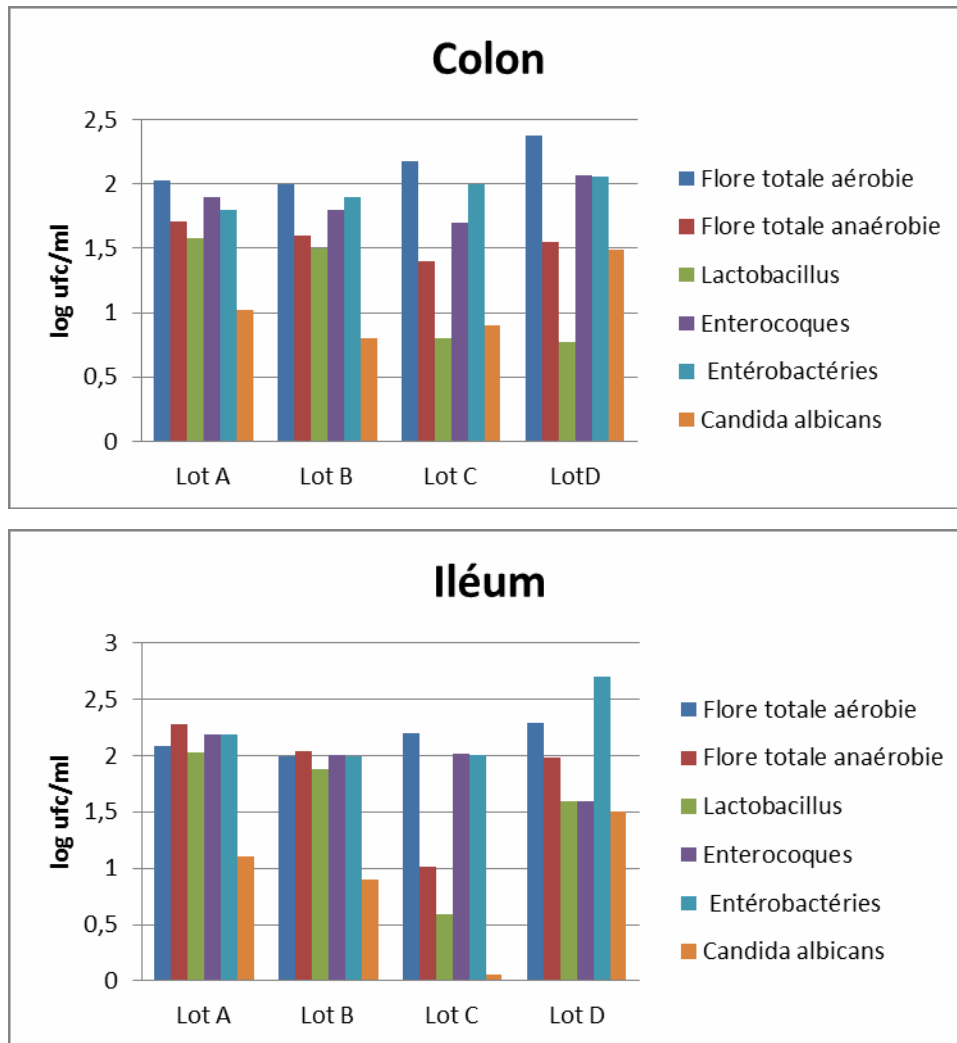


Figure 46 : Translocation bactérienne de la flore intestinale au niveau du colon et l'iléum chez les quatre lots de rats **p<0.001

En analysant ces résultats, le phénomène de translocation bactérienne a été remarqué dans la plupart des lots et même dans le groupe de contrôle (Lot A), ces résultats sont en accord avec les études chez les rongeurs et les lapins en période néonatale (Ogra et Nasonky, 1984). Chez les mammifères, il semble aussi que la translocation bactérienne (TB) se produit spontanément au cours de la première semaine après la naissance, lorsque la colonisation de bactéries dans l'intestin aura lieu (Alverdy et Aoyes, 1991 ; Glod *et al.*, 1977; Van Camp *et al.*, 1993 ; Tir Touil Meddah *et al.*,2001).

Dans le lot D (rats infectés non traités). La translocation bactérienne était abondante dans les différents organes internes et le sang ce qui peut être expliqué par les toxines de *Bacillus cereus*, qui peuvent altérer les jonctions serrées de l'épithélium intestinal en modifiant les structures protéiques et ainsi augmenter la perméabilité para-cellulaire.

Ainsi les démonstrations du passage de bactéries dans la circulation systémique depuis le tube digestif sont nombreuses. L'une des plus évidentes est l'étude de (Sori *et al.*, 1988) après administration des *Escherichia coli* marqués au ¹⁴C à des rats. Une hémorragie est survenue ou sept animaux sur 14 avaient des hémocultures positives à *E. coli* radiomarké au carbone 14. Il semblerait que le degré de la translocation bactérienne de la lumière entérique est liée à la réponse inflammatoire et l'écoulement lent, mais pas au nombre de bactéries présentes dans la lumière. Cela indiquerait que la perturbation de la barrière intestinale est un facteur plus important que la croissance excessive de la microflore intestinale dans la survenue de la translocation bactérienne (Tir Touil Meddah *et al.*, 2001).

Par ailleurs la diminution significative ($p \leq 0,01$) chez la majorité des rats traités par l'extrait phénolique de *Punica granatum* des germes de la flore résidante notamment les bactéries lactiques et les anaérobies stricts dans le tube digestif peut être expliqué par l'effet inhibiteur du germe pathogène sur la croissance de cette flore, en effet Stabb *et al.*, (1994) ont pu démontrer que si les spores de *Bacillus cereus* sont capables de germer dans le tractus gastro-intestinal, ce qui pourrait expliquer l'effet sur la flore intestinale indigène, parce que les cellules végétatives sont connues pour avoir propriétés antibactériennes et antifongiques. Une autre étude intéressante à prouver que les spores de *Bacillus cereus* ont le pouvoir de produire des bactériocines dans l'intestin grêle (Cherif *et al.*, 2003; Duc *et al.*, 2004).

L'augmentation du taux d'entérobactéries et d'entérocoques suite à l'infection par *Bacillus cereus* est déjà démontré par une autre étude montrant que les coliformes étaient significativement importants en nombre dans les intestins de porcelets nourris par le probiotique *Bacillus cereus* var. toyoi (Jadamus *et al.*, 2002).

La contamination de la rate suite à la translocation bactérienne dans le lot infecté non traité (lot D) est due à la fonction filtre de cet organe qui ne protège pas complètement des tube digestif (Baykal *et al.*, 1999). L'infection par *Bacillus cereus* a toutefois conduit aussi à une augmentation de la taille de la rate, la contamination bactérienne du foie, et la colonisation des reins comme *Clostridium* protéolytiques (autre que *C. perfringens*), ceci a été prouvé par Tir Touil Meddah *et al.*, (2001).

D'une façon générale, trois facteurs sont réputés responsables de la translocation bactérienne: l'altération de la barrière muqueuse intestinale suite à des infections intestinales prouvée par la migration de l'ensemble des germes résidents vers d'autres organes internes, l'altération de la microflore intestinale aussi prouvé par la perturbation de quelques germes du tube digestifs et enfin les anomalies des défenses immunitaires qui ne sont encore pas élucidées dans notre étude.

Sachant qu'un taux de la translocation bactérienne élevé augmente la réponse métabolique, ainsi que le développement d'une septicémie, une prédisposition à des complications de la septicémie et la défaillance de plusieurs organes (Brooks *et al.*, 1993 et Haga *et al.*, 1997).

II.6.6. Résultats des analyses histologiques

II.6.6.1. La rate

L'histologie de la rate a été examinée après le traitement par l'extrait phénolique appliqué pour déterminer le niveau de l'inflammation et le pouvoir envahissant de la maladie.

Considérant cet organe comme un organe lymphoïde (comportent un ensemble des cellules lymphocytaires), la rate est faite de deux structures différentes : la pulpe rouge (artériole) et la pulpe blanche ; les coupes histologiques des rats du lot C « infecté traité » ont démontré une augmentation légère de la pulpe blanche par rapport à la pulpe rouge, contrairement au lot D qu'il y avait une augmentation remarquable de pulpe blanche traduisant ainsi une réaction immunitaire de défense. Les deux autres lots A et B n'ont pas présenté un tel changement de point de vue inflammation, nécrose ou hémorragie (figures 47 et 48).

La rate joue un rôle important en matière de compensation des cellules de *Bacillus* dans le sang (Walbaum et Dujardin, 1985). Notre étude confirme la présence et la croissance de *Bacillus* dans la rate des rats du groupe D.

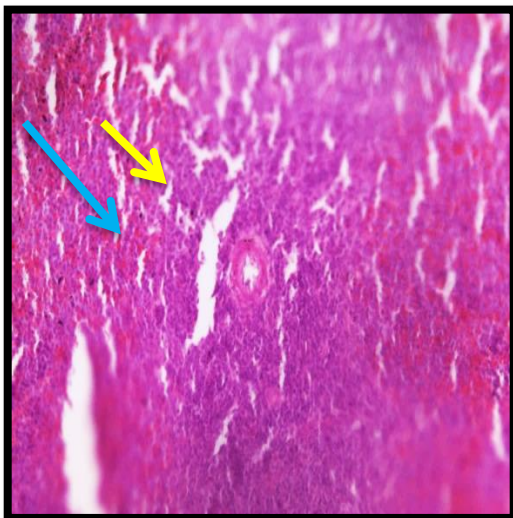


Figure 47 : Coupe histologique de la rate des rats (Lot A) Grossissement (X100)

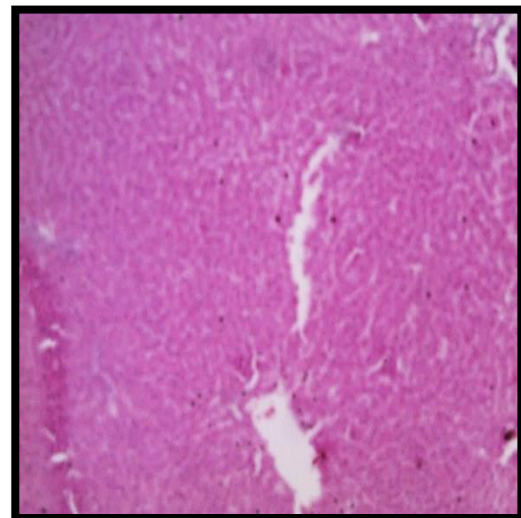


Figure 48 : Coupe histologique de la rate des rats administrés d'extrait (Lot B) Grossissement (X100)

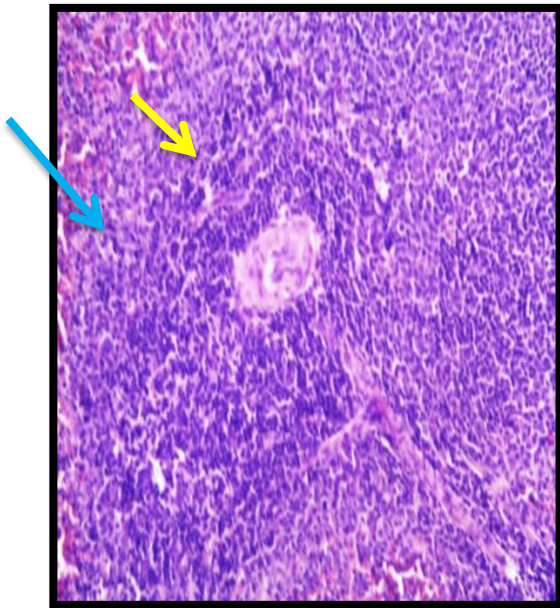


Figure 49 : Coupe histologique de la rate des rats infectés traités (**Lot C**) Grossissement (X100)

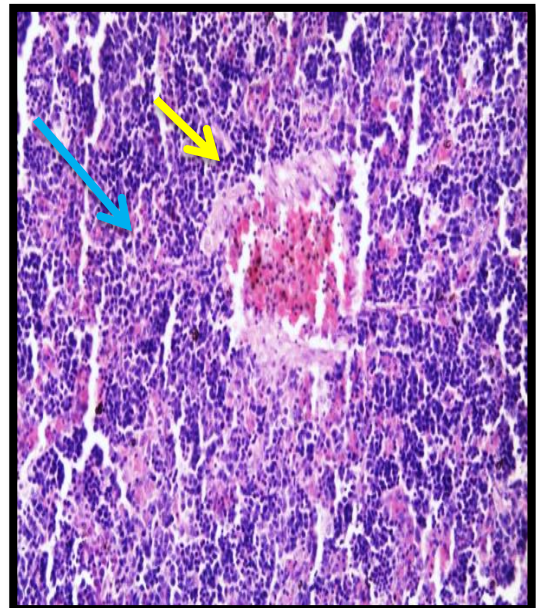


Figure 50 : Coupe histologique de la rate des rats infectés (**Lot D**) Grossissement (X100) **Trie jaune** : pulpe blanche **Trie bleu** : pulpe rouge

II.6.6.2. Le foie

En passant par le foie qui présente une structure assez spéciale caractérisée par une restitution idéale dans lequel les coupes histologiques des rats des différents lots ont présenté une structure hépatique caractérisée par des veines Centro-lobulaires avec un espace porte, l'histologie hépatique n'a montré aucune zone de nécrose, d'abcès ou atrophie (Figure 51).

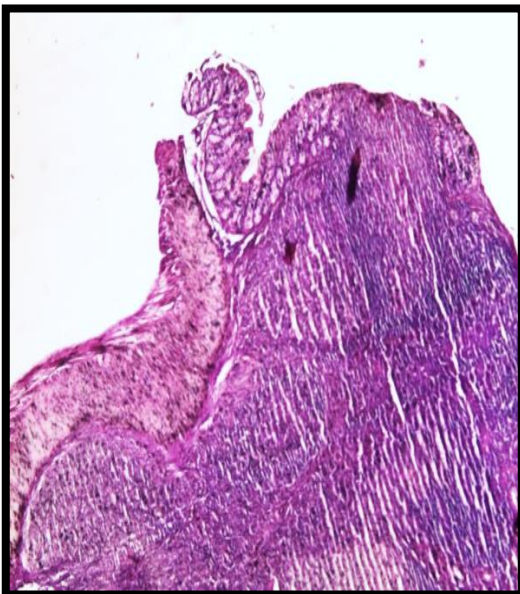


Figure 51 : Coupe histologique du foie des rats (**Lot A**) Grossissement (X100)



Figure 52 : Coupe histologique du foie des rats administrés d'extrait (**Lot B**) Grossissement (X100)

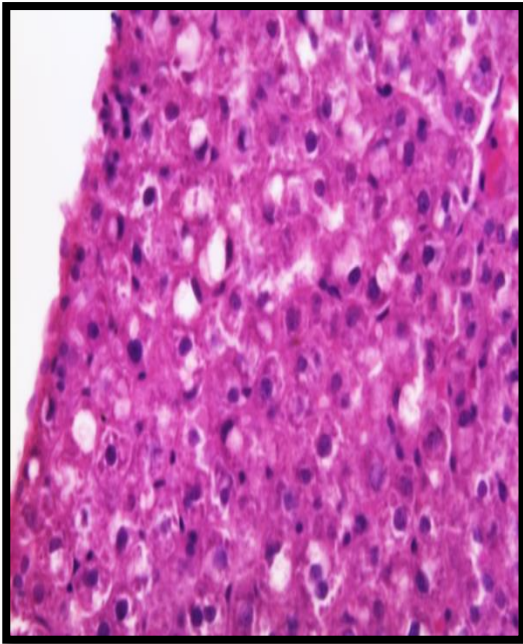


Figure 53 : Coupe histologique du foie des rats infectés traités (**Lot C**) Grossissement (X100)

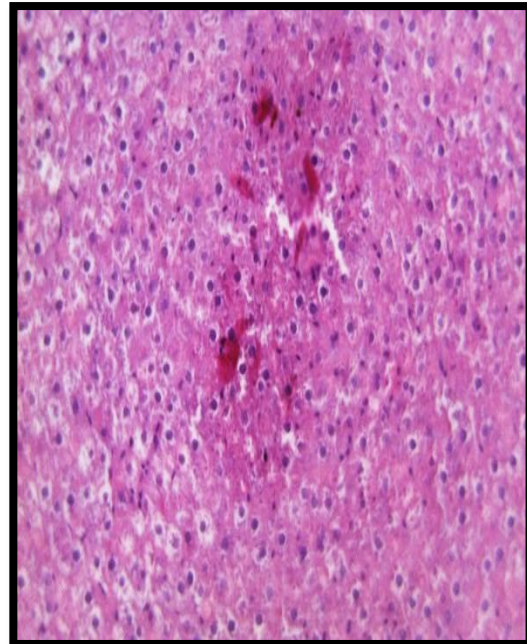


Figure 54 : Coupe histologique du foie des rats infectés (**Lot D**) Grossissement (X100)

Pour le lot A(témoin), le foie des rats a montré généralement une architecture lobulaire Intact et hépatocytes normaux contrairement aux rats présent le lot D, on a pu remarquer lors de la lecture des coupes des hépatocytes élargies avec de nombreuses vacuoles et les través hépatiques dissociées qui est une atteinte tissulaire grave due à la persistance de *B. cereus* dans le corps. En effet, l'apoptose ou une nécrose des hépatocytes reste l'un des principaux signes de lésions hépatiques dues à des composés toxiques (Gricilda et Molly, 2000).

En ce qui concerne le lot traité par l'extrait méthanolique, le Foie était caractérisé par des ports d'infiltration, et enfin et ce qui nous intéresse le plus, dans le lot C (infecté et traité), le foie présentait des Hépatocytes avec une ration cytoplasmique nucléaire bien conservée et très légère inflammation.

II.6.6.3. Intestin

Absence de dommages de l'intestin après l'inoculation des rats par voies orale « lot D » et même ceux infectés traités par l'extrait. L'intestin de surface conserve, sa couleur normale (figure 58). Les villosités des rats des deux groupes ne présentaient aucune anomalie de point de vue trace de destruction ou même atrophie villositaire alors que la présence des cellules lymphocytaires a été considérée comme normale.

La muqueuse intestinale est recouverte d'une couche de gel de mucus, qui agit comme une barrière de diffusion pour les petites molécules et les protège contre la colonisation par des microorganismes pathogènes et leurs toxines, et contre la protéase provenant de microorganismes et des cellules muqueuses. Les principales composantes structurelles de mucus sont mucines: glycoprotéines de haut poids moléculaire produites par les cellules de l'épithélium de surface (Algin C. et al, 2005).

Il est probablement que les protéases sécrétées par *Bacillus cereus* peuvent agir comme un facteur de virulence en permettant l'accès bactérien et l'adhésion aux cellules épithéliales, envahir les tissus de l'hôte et interférer avec le mécanisme de défense de l'hôte.

Il a été approuvé que l'immunité innée est la première ligne de protection contre la l'infection bactérienne; ainsi que les macrophages ayant un rôle important dans la reconnaissance et l'élimination de ces agents pathogènes. Bonne interaction entre l'inné et le système immunitaire adaptatif est nécessaire pour la résistance à *Bacillus cereus* (Vazquez-Torres A. et al, 1999).

Concernant le colon, les rats du lot A et B ont présenté une architecture normale par un nombre élevé de cellules caliciformes avec un nombre décroissant de cellules entérocytaires et des glandes de lieberkhun ; concernant lot C, nous avons noté la présence des glandes normales, une muqueuse normale (pas de diminution) avec un épithélium de type colique (Figure 55), en signalant la présence de lymphocytes à l'état normal.

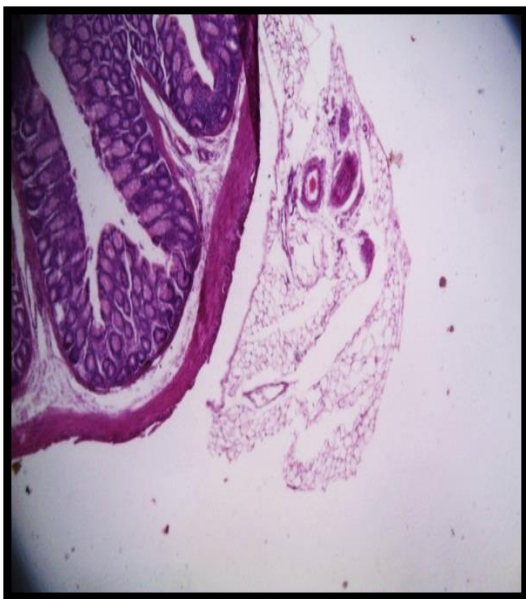


Figure 55 : Coupe histologique d'iléon des rats (Lot A) Grossissement (X100)

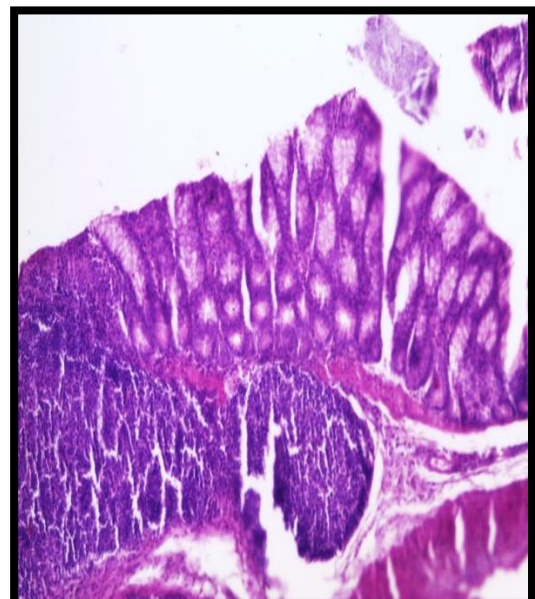


Figure 56 : Coupe histologique d'iléon des rats administrés d'extrait (Lot B) Grossissement (X100)

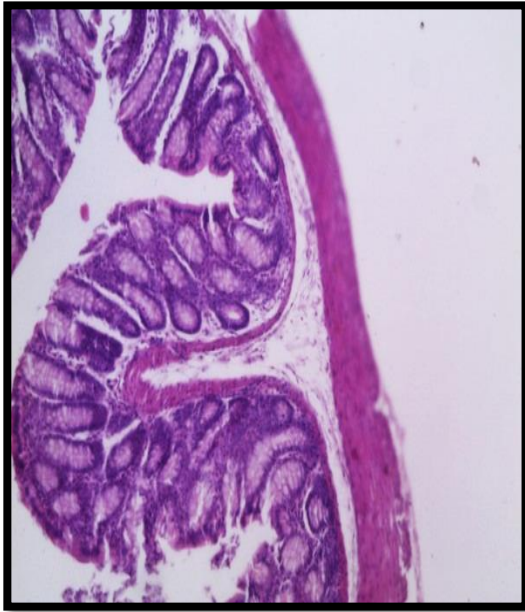


Figure 57 : Coupe histologique d'iléon des rats infectés traités (Lot C) Grossissement (X100)

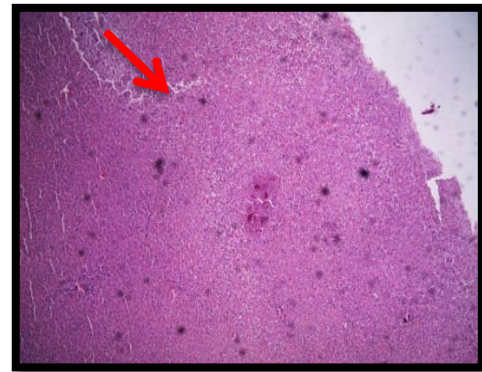
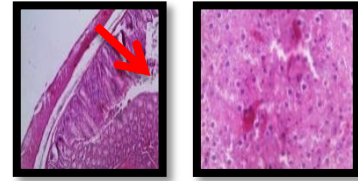


Figure 58 : coupe histologique d'iléon des rats infectés non traités (lot D) Grossissement (X100)

D'après Algin C. et al (2005), La translocation bactérienne dans le tractus gastro-intestinal est inhibée par un système immunitaire sain de la défense, de la muqueuse intestinale et de la microflore gastro-intestinale. Les antibiotiques oraux sont particulièrement efficaces pour perturber l'équilibre écologique gastro-intestinal, conduisant à la prolifération intestinale par certaines bactéries de la flore normale et leur translocation dans le tractus gastro-intestinal.

Algin C. et al (2005) ont travaillé sur l'efficacité d'un traitement basé de *Saccharomyces boulardii* contre la translocation dans le tube digestif chez des rats immunodéprimés dans lequel, il a été avéré que *S. boulardii* a inhibé la translocation à partir du tractus gastro-intestinal en réduisant les niveaux gastro-intestinaux et ils ont constaté que le traitement par voie orale de *S. boulardii* a diminué le nombre de colonies dans le foie, la rate et les reins des rats immunodéprimés.

D'après Huang W. (2004), au cours de la défense de l'hôte contre les infections, les souris ont une anomalie sur les niveaux des neutrophiles, ce qui inclut la mobilisation et la migration de ces dernières dans les organes infectés. Les neutrophiles sont considérés comme être des cellules de défense de l'hôte les plus importantes dans les infections fongiques systémiques.

Il a été approuvé que l'immunité innée soit la première ligne de protection contre l'infection ; les macrophages avoir un rôle important pour la reconnaissance et l'élimination de l'agent pathogène. (Vazquez-Torres A. et al, 1999).

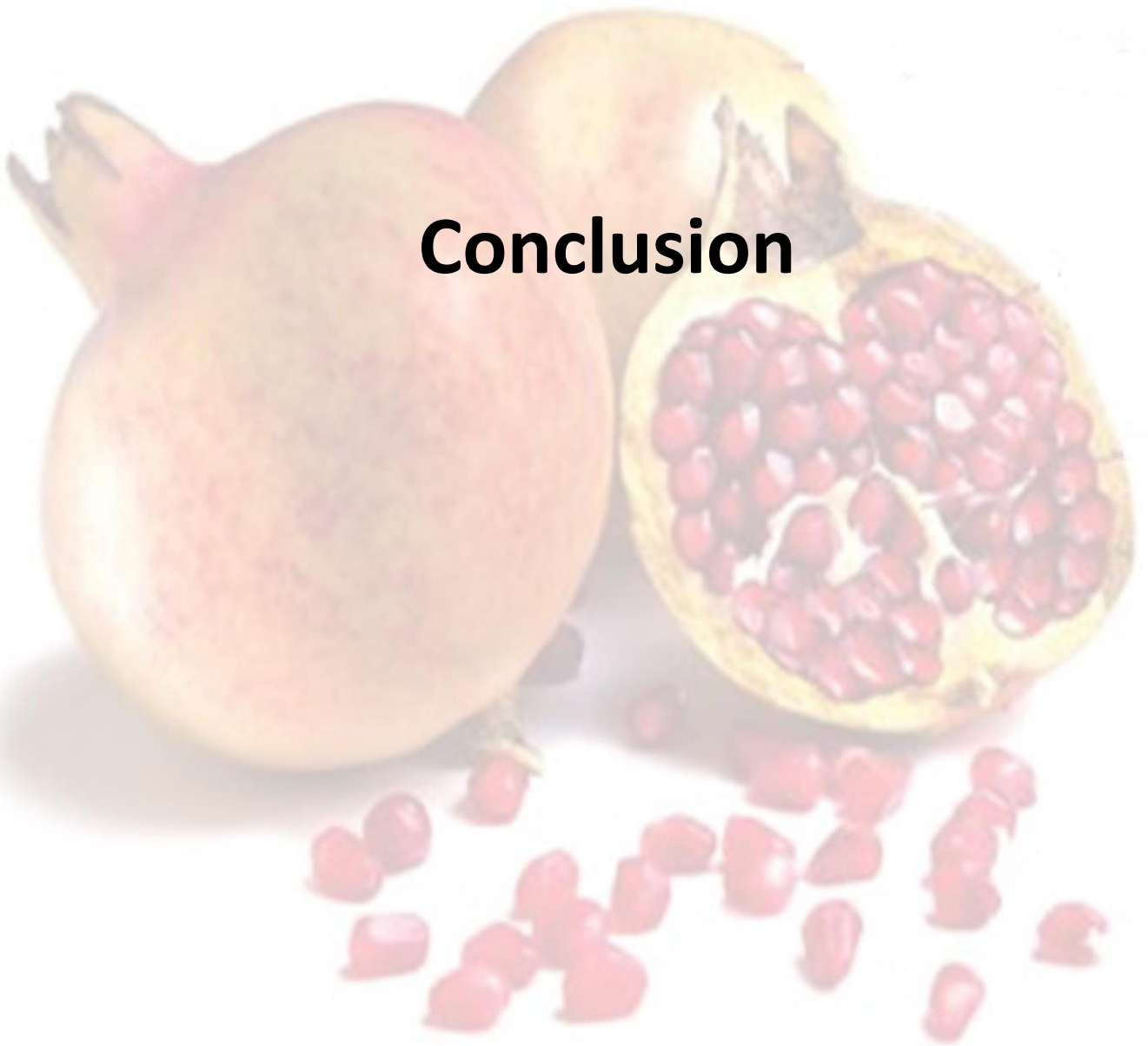
La formulation des traitements administrés joue un rôle très important sur le taux d'exposition des tissus d'une part et sur l'efficacité du traitement d'autre part.

Dans ce contexte, le travail réalisé par Fady I. et al (2012) dans lequel ils ont réalisé une telle formulation d'amphotéricine B à base lipidique sur un modèle de candidose invasive. Amphotéricine B est une formulation à base de lipides par voie orale qui se disperse dans les fluides gastro-intestinaux pour former des nano et micro émulsions. Les gouttelettes de l'émulsion ne sont pas susceptibles d'être absorbés dans la circulation systémique, et donc moins de possibilité de l'absorption et l'accumulation dans le foie et la rate.

Cependant, les mêmes chercheurs ont constaté que l'Amphotéricine B émulsionnée de la formulation à base de lipides montre une absorption croissante en utilisant des mécanismes possibles pour augmenter les propriétés d'absorption limitées d'Amphotéricine B. Ces mécanismes impliqués pourraient fournir le médicament sous une forme moléculaire soluble induisant des changements de fluidité dans la membrane de la muqueuse et l'amélioration des transports lymphatiques.

En signalant que l'efficacité de l'extrait phénolique dans les tissus des organes est probablement basée sur des taux thérapeutiques suffisants après l'administration orale pour réduire la charge bactérienne dans les tissus.

Conclusion





Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Leur utilisation est en progression constante, étant donné la toxicité et les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse. Dans ce contexte, on s'est intéressé à évaluer l'activité antimicrobienne de *punica granatum*, plante utilisée dans la pharmacopée traditionnelle de notre région, pour le traitement de plusieurs maladies

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux effets antimicrobiens des différents extraits du fruit de *Punica granatum*, plante largement utilisée en médecine traditionnelle à travers le monde. Pour cela, nous avons déterminé la composition phytochimique (le dosage des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes, les flavonols, les tannins et la détermination de la composition par HPLC) des extraits phénoliques de *Punica granatum*. Ainsi que leur l'activité antibactérienne ; étude *in vitro* et *in vivo*.

Toutefois, *Punica granatum* révèle une immense richesse en composés phénoliques particulièrement les polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et tannins condensés dans les quatre extraits de *Punica granatum* avec des valeurs variant entre 194.96 ug EAG/mg et 336.14 ug EAG/mg pour les polyphénols totaux, alors que la teneur en flavonoïdes varie entre 9.54 ug EC/mg et 27 ug EC/mg tandis que les valeurs de flavones et tannins condensés varient entre 19.96 ug EQ/mg à 39.01 ug EQ/mg et de 81.86 ug EC/mg à 153 ug EC/mg respectivement

L'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de *Punica granatum* a permis la détection des molécules dotées d'effets biologiques importants telles que l'acide gallique, acide tannique, acide caféique, acide férulique et l'acide elagique.

Des propriétés bactéricides très intéressantes des extraits phénoliques de l'écorce de la grenade ont été trouvés sur les bactéries. Au terme des tests antimicrobiens, nous avons constaté que ces extraits possèdent une très forte activité antimicrobienne avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 12 à 34 mm. L'extrait méthanolique a enregistré une activité antimicrobienne la plus élevée. Cette activité pourrait être expliquée par la présence des composés phénoliques comme l'acide gallique et l'acide caféique qui sont connus pour leurs potentiels antibactériens. Les CMI de l'extrait variaient entre 0.01 et 0.31 mg/ml.



Dans la présente étude la DL_{50} de l'extrait méthanolique calculée est incluse entre 500mg/kg et 8000mg/kg (6000 mg/kg). On en conclut que l'extrait méthanolique de *punica granatum* est considéré comme étant faiblement toxique chez les rats par voie orale et par conséquent cette plante mérite d'être utilisée avec précaution chez l'homme

Le lot traité par l'extraits de *punica granatum* dans cette étude supportaient mieux l'infection par ce qu'il présente une activité antibactérienne significative contre *Bacillus cereus* inoculées dans les rats en réduisant la concentration du germe dans leurs matières fécales à des niveaux indétectables après l'inoculation.

Sachant que *Punica granatum* se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches ultérieures. Donc nous proposons les perspectives suivantes:

- Séparer et caractériser les composés bioactifs et étudier leurs mécanismes d'action séparément.
- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires in vivo de l'activité antibactérienne, antioxydante et anti-inflammatoire des extraits phénolique de *Punica granatum*
- Exploiter ces résultats au niveau de l'industrie agro-alimentaire pour l'utilisation de ces composés bioactifs comme additifs alimentaires naturels

Références bibliographique





- ✚ Abély M. (2010) Flore digestive et antibiothérapie. Archives de Pédiatrie 17, 859-860.
- ✚ Adams, L.S., Seeram, N.P., Aggarwal, B.B., Takada, Y., Sand, D., Hber, D., 2006. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. J. Agric. Food Chem. 54, 980–985
- ✚ Aehle, E., Raynaud-Le Grandic, S., Ralainirina, R., Baltora-Rosset, S., Mesnard, F., African Journal of Biotechnology, 6(12), 1358-1368.
- ✚ Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H., 2005. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK & NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int. J. Cancer. 113(3), 423-433.
- ✚ Ahmed A. Elberry, Fathalla M. Harraz, Salah A. Ghareib, Salah A. Gabr, Ayman A. Nagy, Essam Abdel-Sattar, 2005: Methanolic extract of Marrubium vulgare ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats, International Journal of Diabetes Mellitus.
- ✚ Ajaikumar, KB, Asheef, M., Babu B.H., Padikkala J. 2005. L'inhibition de la muqueuse gastrique blessure par Punica granatum L. Extrait méthanolique (grenade). Journal d'ethnopharmacologie, 96 :171-176
- ✚ Alan L., Miller N.D. 1996. Antioxydant flavonoids: structure, function and clinical usage. Alt Med Rev, 1(2) :103-111.
- ✚ Algin C, Sahin A, Kiraz N, Sahinturk V, Ihtiyar E. Effectiveness of bombesin and Saccharomyces boulardii against the translocation of Candida albicans in the digestive tract in immunosuppressed rats. Surg Today. 2005;35:869–873
- ✚ Alverdy J, Aoye E., 1991. The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Ann Surg 214, 719–723
- ✚ Al-Zoreky, N.S., 2009, International Journal of Food Microbiology; 134, 244–248. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. Flavour Fragrance Journal, 25, 13–19.
- ✚ Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonogai, Y., 2000b. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. Journal of Chromatography A 896, 87–93.
- ✚ Andersson A, Granum PE & Ronner U, 1998. The adhesion of Bacillus cereus spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. Int J Food Microbiol 39: 93–99.



- ✚ Aranda MJ, Gianella RA. 1999. Acute diarrhea: A practical review. *Ame. J. Med.*, 106, 670-676.
- ✚ Arboleyaa Silvia, Ruas-Madiedo Patricia, Margolles Abelardo, Solísb Gonzalo, Salminen Seppo, Reyes-Gavilán Clara, Gueimonde Miguel. (2010) Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk. *Sciences & Technologie* 12, 125-131.
- ✚ Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* 104:21-29.
- ✚ Artik, N., Murakami, H., Mori, T., 1998. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing.* 12, 492-499.
- ✚ Aruoma, O I. (1999) Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 8: 53-63.
- ✚ Aruoma OI, Spencer JPE, Butler J et Hilliwell B, 1995. commùentary reaction of plant derived and syntitic antioxidants whith trichloromethylperopxyl radicals. *Free rad. Res.* 22,187-190 p.
- ✚ Aviram M. et al., Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr.* 2004 Jun;23(3):423-33.
- ✚ Avril jean-loup, 1997 : Nouveau dictionnaire de bactériologie clinique ; Ellipses Pp 121-125.
- ✚ Backman PA, Wilson M., and Murphy J. F., 1997. Bacteria for Biological Control of Diseases in Rechcigl and Rechcigl, eds., *EnvironmentallySafe Approaches to Crop Disease Control.* pp. 95-109.
- ✚ Baborun T, Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dinet T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C., and Pinkas M.,1996 ,Oxygenspecies scavenging activity of phenolic extracts from hawtorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations.*Arzneimlforsch/Drug Res.*, 46(11): 1086-1089.
- ✚ Baum Nathalie 1988.Arbres Et arbustes de l'Egypte ancienne.peeters publishers Numero 81,381 :149-152.
- ✚ Baykal A, Aydin C, Hasçelik G, Ayhan A, Korkmaz A, Sayek I,1999.Experimental study of the effects of splenectomy and partial splenectomy on bacterial translocation. *J Trauma* ; 46 : 1096-9.
- ✚ Belkacem N , 2009. Contribution à l'étude des propriétés antidiabétiques de *Punica granatum* L. (grenadier) chez le rat diabétique pp.59.
- ✚ Belyagoubi L., 2006. Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid, 110p.



- ✚ Benmehdi, H ; (2000). Valorisation des plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Thèse de Magister. Chimie organique
- ✚ Benzi F 1999. L'histoire des plantes en Méditerranée : art et botanique. Editions actes sud ,175 :80-81
- ✚ Bernard Boullard 2001. Plantes médicinales du monde. Croyance et réalité. Editions Estem, 635 :437-438.
- ✚ Bhargava, U.C., Westfall, B.A., 1968. Antitumor activity of *Juglans nigra* (black walnut) extractives. *J. Pharm. Sci.* 57(10), 1674-7
- ✚ Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003) Radicaux libres et anti-oxydants. In : Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Médecine- sciences. Flammarion (Ed). Paris, pp 59-81.
- ✚ Booth N.L Dejan N., Richard B., Stoci E., 2004. New lanthanide complexes of 4-methyl-7-hydroxycoumarin and their pharmacological activity. *Clinical pharmacology and therapeutics* ,50:120-123.
- ✚ Bravo L., 1998. Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance ; nutrition reviews ; 56(11) : 317-333.
- ✚ Brooks SG, May J, Sedman P, Tring I, et al., 1993. Translocation of enteric bacteria in humans. *Br J Surg* 80,, 901–902
- ✚ Brouillard, R., 2005. The flavonoids Advances. In: research since 1993. Harborne J B, Chapman and Hall, London. 525-538 p.
- ✚ Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales ; Ed 2: TEC et DOC.
- ✚ Bruneton, J. (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p.
- ✚ Burcelin Rémy, Amar J. (2009) Flore intestinale et maladies métaboliques. Médecine des maladies Métaboliques 3, 159-163.
- ✚ Campeotto Florence, Waligora-Dupriet Anne-Judith, Doucet-Populaire Florence, Kalach Nicolas, Dupont Christophe, Butel Marie-José (2007) Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 31, 533- 542.
- ✚ Canillac, N., Mourey, A., 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18, 261– 268.
- ✚ Cano Noël, Barnoud Didier, Schneider Stéphane, Vasson Marie-Paule, Hasselmann Michel, Leverve Xavier (2007) Traité de nutrition artificielle de l'adulte. éd. Springer. 365-368.
- ✚ Cerda, B., Ceron, J.J., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C., 2003. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J. Agric. Food Chem.* vol. 51, no 11.



- + Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C., 2007 Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100: 553-559.
- + Chakass M.A., Carbonnier-Jarreau M.C., Verhille A.M., Reduron J.P., 2007. Étude palynologique de trois variétés du grenadier (*Punica granatum*) au Liban. *Acta Botanica Gallica*, vol 154, no 1, p. 27-42.
- + Chérif M., Arfaoui A. et Rhaïem A., 2003. Phenolic compounds and their role in biocontrol and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of Plant Protection* (2): 7-21.
- + Choi, JG., Kang, OH., Lee, YS., Chae, HS., Oh, YC., Brice, OO., Kim, MS., Sohn, DH., Kim, HS., Park, H., Shin, DW., Rho, JR y., Kwon, DY., 2009 *Evid Based Compl Alter Med* 17 , 1-8
- + Clavel T., Carlin F., Lairon D., Nguyen C., and Schmitt P., 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach: *J Appl Microbiol* 97:214-219.
- + Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* ,12, 564-582, 1999.
- + Cray W.C, Moon H.W., 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7: *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1586-1590.
- + Das H, Wong J et Lien E, 1994. Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoides: A structure-system-activity-relationship (SSAR) analysis.
- + Deina M., Rosa A., Casu V., Ctiglia F., Bonsignore L., 2003. Natural product : their chemistry and biological significance. *Journal of the American oil chemistry society* , 80:65-70.
- + Delmas G., Jourdan da Silva N., Pihier N., Weil F. X., Vaillant V., De Valk H., 2010. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 31-32, 344-348.
- + Delzenne Nathalie M., Cani Patrice D. (2009) Modulation nutritionnelle de la flore intestinale : une nouvelle approche diététique dans la prise en charge de l'obésité ?. *Cahiers de nutrition et de diététique* 44, 42-46.
- + Dessein R., Rosenstiel P., Chamaillard M. (2009) Quel rôle pour la flore intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales?. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 33, S131-S136.
- + Diezi J., 1989. Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. In "pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques". Ed. Slatkine-Geneve, pp. 3344.



- ✚ Didry N, Pinkas M et Torck M, 1982. La composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *degaindelia*. *PI med. Phytother.* XVI. 7-15 p.
- ✚ Dragsted, A., Lang, B., 1957. Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. *Annales pharmaceutiques Française*, p.11.
- ✚ Dramane S., et al ; 2010. Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire ; *Euro Journal of Scientific Research* 40 (2) ; p: 307-317.
- ✚ Duc L.H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M., 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use: *Appl Environ Microbiol* 70: 2161–2171.
- ✚ Ducourthial G 2003. Flore magique et astrologique de l'Antiquité. Edition Belin, 655:69, 187-188 et 513.
- ✚ Druyne T. 1999. Condensed vegetable tannins : biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and ecology.* : 27.(4): 445-459.
- ✚ Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Youcefzadi M., 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry.*, 110:927-931.
- ✚ Edeoga H.O., Okwu D. E. and Mbaebie B.O. 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 7 (4) : 685-688.
- ✚ Erkan M., Kader A.A., 2011. Pomegranate (*Punica granatum* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Mangosteen to White Sapote*, pp. 287e-313e.
- ✚ Esmailzadeh A., Tahbaz F., Gaieni I., Alavi-Majd H., Azad- Bakht L., «Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia.», *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2006; 76, 3: 147–151.
- ✚ Fady Ibrahim, Pavel Gershkovich, Olena Sivak, Ellen K. Wasan, Karen Bartlett, Kishor M. Wasan, (2012): Efficacy and toxicity of a tropically stable lipid-based formulation of amphotericin B (iCo-010) in a rat model of invasive candidiasis, *International Journal of Pharmaceutics* 436; 318– 323.
- ✚ Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelesi, N., Boulaaba, M., Abdely, C., 2008, Phenolic composition of *cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C.R. BIOLOGIES*. 331:372-379
- ✚ Fiorucci ., 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : approche par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de Doctorat. Nice, 211 p.



- ✚ Flandrois Jean-Pierre, 2002 : Bactériologie Médicale. Ouvrage collectifs de l'association des professeurs de bactériologie-virologie-hygiène hospitalière de faculté de médecine. Pages 66 et 100
- ✚ Ford R.A., Hawking D.R., Mayo B.C., Api A.M., 2001. The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and chemical toxicology*, 39:153-162.
- ✚ Frankel E.N., Waterhouse A.L., Teissedre P.L., 1995. *Agric. Food. Chem.*, 43, 221-235 p.
- ✚ Gil M.I., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pièrce B., Holcroft D.M., Kader A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 48, n° 10, p. 4581-9.
- ✚ Gilly G., 1997. « Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse ». L'HARMATTAN, Paris, pp : 11-19.
- ✚ Godet J.D., 1991- Arbres et arbustes aux quatre saisons. Les guides pratiques du naturaliste. Ed. Delachaux et Niestlé, France, 215.96-170pp
- ✚ Goulet O. (2009a) La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 22, 102-106.
- ✚ Griess S., 2013. Les problèmes posés par *Bacillus cereus* dans l'industrie
- ✚ Gricilda S.F., Molly T., 2001. Study of anti-diarrhoeal activity of four medicinal plants in castor oil induced diarrhoea : *J. Ethnopharmacol.*, 76:73-76.
- ✚ Guinnard J.L., 1998. Abrégé de botanique. Masson (Ed), Paris, 212p.
- ✚ Gulçin, İ., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., & Hisar, O. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L.). *Turkish Journal of Biology*, 34, 175–188.
- ✚ Haga Y, Beppu T, Houichi D, et al., 1997. Systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunction following gastrointestinal surgery. *Crit Care Med* 25, 1994–2000.
- ✚ Hagerman A.E. 1989. Chemistry of tannins – protein complexation in chemistry and significance of tannins (R. W. Hemingway and J. J. Karchesy. Eds), Plenum Press: 323-333.
- ✚ Haidari et al. 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir, University of Texas Health Science Center at Houston, USA.
- ✚ Hamimed., 2009. Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. Thèse de magister en chimie organique, université Mentouri, Constantine : p 31.



- ✚ Hamza N., 2011. Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J, thèse de doctorat en sciences alimentaires, Université de Constantine, Algérie.
- ✚ Hartman R. E. Et Al., «Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease.», *Neurobiol. Dis.*, 2006; 24, 3: 506–515
- ✚ Havelaar A.H., Jgarssen K., Takumi M.A., Koedam J.B., Dufrenne F.M., Bousema J.T., and Vos J.G., 2001. A rat model for dose-response relationships of *Salmonella enteridis* infection: *Journal of applied Microbiology*, 91, (442-452).
- ✚ Hayase F et Kato M, 1984. Antioxydant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci. vitaminol.* 30, 37-46 p.
- ✚ Hermon B.G., Brown C.A., Tkalcic S., Mueller P.O.E, Doyle P., 1999. Faecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* in fasted calves: *J. Food Protection*, 62: 574-574.
- ✚ Herek, G. M., 2000. Sexual prejudice and gender: do heterosexuals' attitudes toward lesbians and gay men differ?. *Journal of Social Issues*, 56(2), 251-266.
- ✚ Hedqvist H. 2004. Metabolism of Soluble Proteins by Rumen Microorganisms and the Influence of Condensed Tannins on Nitrogen Solubility and Degradation. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala (Suweden).
- ✚ Hilaly J.E., Israili Z.H., Lyouss B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 43–50.
- ✚ Hill M.J., Marsh P.D. (1990) Human microbial ecology. *Scientific Dairy Journal* 52 57, 59, 62-65.
- ✚ Hoa T.T., Duc L.H., Istaticato R., Baccigalupi L. Ricca E., Van P.H., Cutting S.M., 2001. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model: *Appl Environ Microbiol* 67: 3819–3823.
- ✚ Hoffmann E.M., 2003. A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds. *British Journal of Nutrition*, 87 : 421–426
- ✚ Hopkins M.J., Sharp R., Macfarlane G.T. (2002) Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Diseases* 27, 12-18.
- ✚ Horgan AF, Stuart RC, O'Shaughnessy EM, Cryan B, Kirwan WO., 1994. Bacterial translocation during peroperative colonic lavage of the obstructed rat colon. *Br J Surg*; 81 : 1796-8.-*9.



- ✚ Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., and Prior R., 2005. High- throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J. Agric. Food Chem.* 50:4437-4444.
- ✚ Hümmer, W. & Schreier, P. (2008) Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 12, 1381-1398.
- ✚ Husmark U., and Ronner U.,1992. The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores: *Biofouling* 5: 335–344.
- ✚ Itelima J.U., and Agina S.E.,2014. In vivo antimicrobial activity of plant species on *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into albino rats: *World Journal of Microbiology* Vol. 1(1), pp. 002-009.
- ✚ Jacquiera H., Cruaud P., Poilane I., Lachassinne E., Gaudelus J., Collignon A., 2007. Activité in vitro de la moxifloxacin (8-méthoxyquinolone) seule ou en association avec le céfotaxime sur les streptocoques du groupe B, *ScienceDirect. Pathologie Biologie* 55. 412–417.
- ✚ Jadamus A, Vahjen W, Schafer K & Simon O ,2002. Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 86: 42–54.
- ✚ Jayaprakasha G.K.,Negi P.S.,Jena B.S.2006.In :np seeram , pomgranates : Ancient Roots to Modern Medicine p.167-183.CRC/Press/Taylor and Francis ,Boca Raton
- ✚ Jung k.h. et al., «Suppressive effect of *Punica granatum* on the production of tumor necrosis factor (Tnf) in BV2 microglial cells.» *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006; 29: 1258–1261.
- ✚ Julkunen-Titto R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods.
- ✚ Jothy, S.L. Lee, W.et al. 2011. Phytochemicals screening, dpph free,radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract *journal of medicinal plants research*, v.5, n.10, p.1941-1947.*journal of nutrition*. 4: 379-381.
- ✚ Kadaoui K.A., and CorthésyB., 2007.Secretory IgA Mediates Bacterial Translocation to Dendritic Cells in Mouse Peyer’s Patches with Restriction to Mucosal Compartment. *J. immunol.* 179, 51-57.
- ✚ Kahlmeter G., Brown D.F.J., Goldstein F., Macgowan A.P., Mouton J.W., Osterlund A., Rodloff A., Steinbakk M., Urbaskova P. and Vatopoulos A. ,2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria.
- ✚ Karumi, Y; Onyeyili, P.A; Ogugb uaja, V.O; (2004). Identification of active principales of balsamina (Balsam apple) leaf extract. *J. Med. Scien.* 4: 179-182.



- ✚ Kaur G., Jabnbar Z., Athar M., Alam M.S., 2006. Punica granatum (pomegranate) flower extract processes potent antioxidant activity and abrogates FE-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and chemical toxicology*, 44: 984-993.
- ✚ Khababae K. and Van Ree T. 2001. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, 18 : 641–649.
- ✚ Kostova, I., 2005. Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. *Curr.Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 5, 29-46.
- ✚ Khan N., Hadi N., Afaq F., Syed D. N., Kweon M. H., Mukhtar H., «Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice.», *Carcinogenesis*, 2007; 28, 1: 163–173
- ✚ Kawaii S., Lansky E. P., «Differentiation-promoting activity of pomegranate (Punica granatum) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells.», *Journal of Medicinal Food*, 2004; 7: 13–18.
- ✚ Langhendries J.P. (2006) Colonisation bactérienne de l'intestin dans l'enfance : pourquoi y accorder autant d'importance ?. *Archives de Pédiatrie*, 13, 1526-1534.
- ✚ Lansky, E.P., Harrison, G., Fromm, P., Jiang, W.G., 2005. Pomegranate Punica granatum) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Investigational New Drugs*. 23, 121-2.
- ✚ Lansing M., Prescott J., Harley P., Klein DA., 2003 .*Microbiologie*. 2eme Edition française : De boeck . 1164 pages
- ✚ Larousse., 2001.encyclopédie des plantes médicinales identifications, sois 2eme édition avril p : 14,15,16,17.
- ✚ Leblanc,B.,2015. Les plantes comme sources de nouvelles molécules bioactives & chimie du végétal,dossier de presse, Signature d'une convention de partenariat entre le Conseil Régional de Lorraine –BASF
- ✚ Lee K.W., Kim Y.J.,Lee H.J.,Lee C.Y.,2003. Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine.*Food Chemistry*., 51:7292-7295.
- ✚ Lei Lu et Walker W. A. (2001) Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *American journal of clinical nutrition* 73, 1124S– 30S.
- ✚ Leinmüller E., Steingass H. and Menke K.H. 1991. Tannins in Ruminant feed stuff. Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany).
- ✚ Leverve Xavier, Cosnes Jacques, Erny Philippe, Hasselmann Michel (2001) *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. éd. Springer. 297



- ✚ Leyral Guy et Vierling Elisabeth ,1996 : Microbiologie et toxicologie des aliments .Doin editeurs ,Centre Regional de documentation Pedagogique d'Aquitaine .Page70-72 , 221
- ✚ Li Y., Wens S., Kota P.B., Peng G., Li G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D., 2005. Punica granatum flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic Fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 99:239-244.
- ✚ Lima,K., Melissa Negro-Dellacqua, Victor Emmanuell Fernandes Apolônio dos Santos and Célia Maria Machado Barbosa de Castro, 2015. Post-splenectomy infections in chronic schistosomiasis as a consequence of bacterial translocation, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(3):314-320
- ✚ Logan N. A., 1988. Bacillus species of medical and veterinary importance, *J. Med. Microbiol.* Vol. 25, 157-165.
- ✚ LOREN D. J., SEERAM N. P., SCHULMAN R. N., HOLTZMAN D. M., «Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuro- protective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury.», *Pediatric Research*, 2005; 57: 858–864.
- ✚ Macheix J J., Fleuriet A. et Jay–Allemand C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- ✚ Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P., 2008. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*. 21: 229-240.
- ✚ Majob F., Kamalinejab M., Ghaderi N., Vahidipour H.R., (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranien Journal of Pharmaceutical Research*. 77-82.
- ✚ Makkar H.P.S. 2003.Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannins-rich feeds.*Small Ruminant Research*,49:241-256.
- ✚ Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A., 2007. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes.
- ✚ Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N. (2007) Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432.



- ✚ Martin S., Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51:304-315.
- ✚ Mathers JC, Smith H & Carter S.,1997. Dose–response effects of raw potato starch on small-intestinal escape, large-bowel fermentation and gut transit time in the rat. *Br J Nutr* 78:1015–1029.
- ✚ McCarthy D., Matthew Kiuger J., and Arthur J., 1985. Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved.
- ✚ Merret ND, Jorgenson J, Schwartz P, Hunt DR.,1994. Bacteremia associated with operative decompression of a small bowel obstruction. *J Am Coll Surg* ; 179 : 33-7.
- ✚ Miller LC, Tainter MC. 1944. Estimation of LD50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proc. Soc. Exp. Boil. Med.*, 57: 261-264.
- ✚ Miliuskas. G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A.,2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chemistry* .85:231-237.
- ✚ Mukherjee P.K., Saha K., Murugesan T.,Mandal S.C., 1998. Screening of anti- diarrheal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, Indian. *J. Ethnopharmacol.*, 60:85-89.
- ✚ Mukinda J.T.,& Syce J.A., 2007. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 138-144.
- ✚ Murphy Cowan M .2004. Plants as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582
- ✚ Nauciel .C ;2000 :Bactériologie medicale.Edition Masson –Paris .Pp133-137
- ✚ Naz S., Siddiqi R., Ahmad S., Rasool S., Sayeed S. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum* .*Journal of Food Sciences* ,72, 341– 345 ,2007.
- ✚ Negi P.S.et Jayaprakasha G.K.,2003, Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts .*Journal of Food Sciences* , 68 , 1473–147.
- ✚ Neurath A. R., Strick N., Li Y. Y., Debnath A. K., «*Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide.», *BMC Infect. Dis.*, Oct. 2004; 4:41.
- ✚ NCCLS. 2005. Seventeenth Informational supplement. NCCLS document, M100-S17.
- ✚ Newsletter N°8. (site) 2005. Elément actifs du mois, par l'équipe Parabolic biologicals.
- ✚ OMS, 2015.Organisation Mondiale de Santé, « Antibiotiques : à manipuler avec précaution »
- ✚ Ogra PL, Losonky GA., 1984. Defense factors in products of lactation. In Ogra PL (ed) Neonatal infection. Nutritional and immunologic interactions. Grune and Stratton,Orlando , pp 205-219.



- ✚ Ojetti V., Gigante G., Ainora M., E., Fiore F., Barbaro F., Gasbarrini A. (2009) Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. *Digestive and Liver Disease* 3, 35- 39.
- ✚ Oloyede, O.I; (2005). Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. Pakistan
- ✚ Otshudi A.L., Foriers A., Vercruyse A., Van Zeebroeck A., Lauwers S., 2000. In vitro antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo: *journal of Phytomedicine*, 7,167-177.
- ✚ Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M-E., Topcu, G. 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chem.*103: 623-630.
- ✚ Pan X.L., Yang Y., Zhang J.R, 2014. Molecular basis of host specificity in human pathogenic bacteria. *Emerg Microbes Infect*; 3: e23.
- ✚ Piquemal G.,2004. Documents and setting/mb/Flavo-perso.htm.
- ✚ Plantefève,G.,Bleichner,G.,2001.Translocation bactérienne : mythe ou réalité ?
- ✚ Prescott Lansing M., Harley John P., Klein Donald A., Bacq-Calberg Claire-Michèle, Dusart Jean (2003) *Microbiologie*. éd. De Boeck. 702.
- ✚ Prouillet, C., Mazière, J.-C., Fliniaux, M.-A., 2004. Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chemistry*, 86, 579-585.
- ✚ Ponce A.G., Fritz R., De Lvalle C., Roura S.I., 2003 , Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard , *Lebensm –Wiss.U-Technol*,36 :679-684.
- ✚ Psotova, J., Lasovsky, J., Vicar, J.,2005. Metal chelating properties.electrochemical behavior. scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. *Biomed.* 174-153 p.
- ✚ Radojević I., Stanković O., Topuzović M., Čomić L. and Ostojić A., 2012. Great Horestail (*Equisetum telmateia* Ehrh.): Active Substances Content and Biological Effects. *Experimental and Clinical Sciences International Journal*, Vol. 11:59-67.
- ✚ Rambaud Jean-Claude, Buts Jean-Paul, Corthier Gérard, Floulié Bernard (2004) *Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives*. éd. John Libbey. 21-46.
- ✚ Ramírez, J.H., Palacios, M.Tamayo, O.,Jaramillo, R.,Gutiérrez, O.,2007. Acute and subacute toxicity of *Salvia scutellarioides* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 348- 353.
- ✚ Rasekh, H.R., Nazari, P., Kamli-Nejad, M., Hosseinzadeh, L., 2008. Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 21-26.



- + Raza, M., Al-Shabanah, O.A., El-Hadiyah, T.M., Al-Majed, A.A., 2002. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica* 70, 135– 145.
- + Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D., 2007 Antioxydant, activités 1089. antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. 3: 43-53. antipaludiques et antimicrobiennes de fractions riches en tanins, acides phénoliques et ellagitannins de *Punica granatum* L. *Planta Med*, 73: 461-467.
- + Rollan S. (1997) L'intestin grêle le reflet de notre image santé. 2- 11.
- + Ronald A. Greenfield et Wendy A. Joyce, (1993): Gastric colonization with *Candida albicans*, *Mycopathologia* 122: 1-5.
- + Ronner U, Husmark U & Henriksson A ,1990. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J Appl Bacteriol* ,69: 550–556.
- + Rosenblat M., Hayek T., Aviram M., 2006. Antioxidative effects of pomegranate juice consumption by diabetic patients on serum and on macrophage. *Atherosclerosis*, 187: 363-371.
- + Ruemmele F. (2007) Flore intestinale et immunité. *Archives de pédiatrie* 2, 1-3.
- + RufengW, Yi D, Ruining L, Lan X, Lijun D. 2010. Pomgranates :constituents ,bioactivité and pharmacokinetics ,fruit ,vegetable and cereal science and biotechnology4 (special issue 2):78-87, Global Science Books.
- + Salah Eddine L., 2015. Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf), Thèse de doctorat en chimie industrielle, Université Mohamed Khider Biskra.
- + Sarmi P. & Chyemer, M.A. (2006) Structural characterisation of flavonoids and flavonoid-O-glycosides extracted from *Genista tenera* by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15, 18, 1760-1767.
- + Sasaki K, Takahashi T. 2002. A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochem.* , 61 (3): 339-43.
- + Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W. Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *J. Comp. Physiol. Sensory Neural Behav. Physiol.* 2000, 186 (6): 567-74.
- + Schmidt R, Lang F, Heckmann M. ,2011. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer.



- ✚ Shukla M., Gupta K., Rasheed Z., Khan K. A., Haqqi T. M., «Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis.», *Nutrition*, 2008 May 17, Online-Publikation vor Druck.
- ✚ Schubert S.Y., Lansky E.P., Neeman I., 1999. Antioxidant and eicosanoïd enzym inhibitionproperties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoïds. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 11-17
- ✚ Seeram N.,Schulmar R.2006 .Pomegranate.Ancient roots to modern
- ✚ SFM. Société Française de Microbiologie. 2010, comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandation 2010, édition de janvier 2010.
- ✚ Shimada., 2003. *Nat. Med.* 57(2003) 464.
- ✚ Sori A, Rush JB, Lysz T, Smith S, Machiedo G.,1988. The gut as source of sepsis after hemorrhagic shock. *Am J Surg* ; 155 : 187-92.
- ✚ Spichiger R.E,Savolainen V.2004.Botanique systematique des plantes à fleurs.Une approche phylogénétique nouvelle des Angiosperme des régions temperes et tropicales.Editions Presses polytechniques et universitaires romandes.Troisième édition.413 pages.
- ✚ Stabb EV, Jacobson LM & Handelsman J.,1994. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils.*Appl Environ Microbiol* 60: 4404–4412.
- ✚ Stratil . P.,Klejdus,B et Kouban ,V.,2007.Détermination des composes phénoliques et leurs propriétés antioxydantes. activité dans les fruits et les céréales .*Talanta*,71 :1741- 1751.
- ✚ Sumner M. D. et al., «Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease.», *Am. J. Cardiol.*, 2005; 96, 6: 810–814
- ✚ Syed D. N., Malik A., Hadi N., Sarfaraz S., Afaq F., Mukhtar H., «Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVAmmediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes.», *Photochem. Photobiol.*, 2006; 82, 2: 398–405.
- ✚ Taga M. E., Bassler B. L. and Chemical communication among bacteria (2005) Développement et validation d'un nouveau modèle de fermentation colique in vitro avec cellules immobilisées. éd. Université Laval. Québec. p. 8.
- ✚ Tahraoui A., Israili ZH., & Lyoussi B., 2010.Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 48-55.
- ✚ Tams TR., 1986. Chronic feline inflammatory bowel disease. Part I: Idiopathic inflammatory bowel disease. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 8, 371-376.
- ✚ Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology* 179, 183–196.

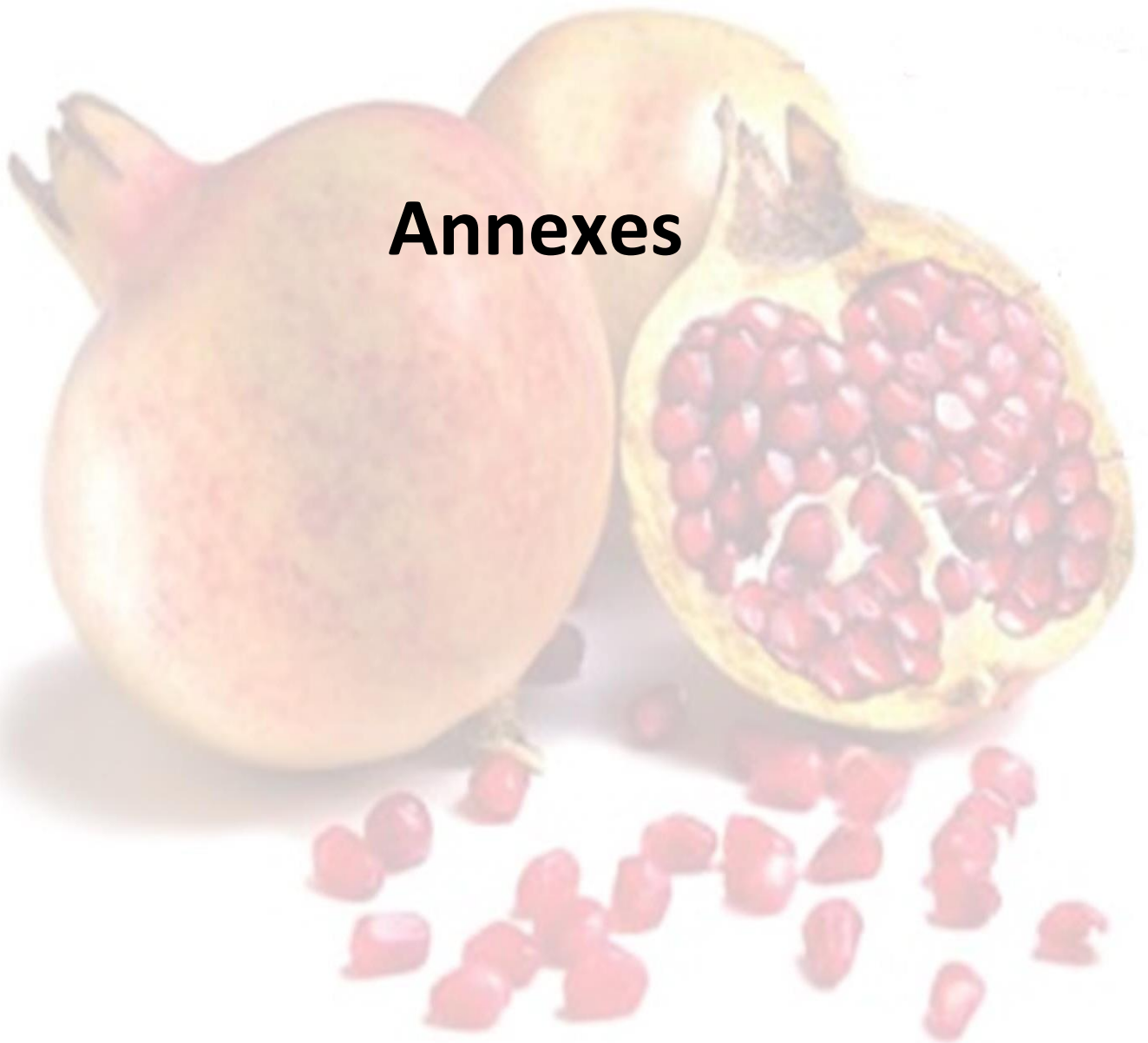


- ✚ Teyssou P., Hance E., Nicand J.Y., Nizou Y., 1998. Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie, clinique et traitement, La Lettre de l'Infectiologue - Tome XIII.
- ✚ Tiihonen Kirsti, Ouwehand Arthur C., Rautonen Nina. (2010) Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews* 9, 107-116.
- ✚ Tir Touil Meddah, T., L. Leke · M. B. Romond, E. Grenier · C. Cordonnier · B. Risbour, J. P. Canarelli, 2001. The effect of mesenteric ischemia on ileal colonization, intestinal integrity, and bacterial translocation in newborn, *pediatr surg int.*
- ✚ Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., Polat, G., 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12:484-496.
- ✚ Van Camp JM, Tomaselli V, Drongowski R, Coran AG (1993) Bacterial translocation in the newborn, the effect of age on frequency of translocation. *Circ Shock* 2,, 42-43.
- ✚ Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Wagner R.D, Warner T, Balish E. (1999): Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. *Infect Immun*; 67: 670 - 4.
- ✚ Verbois Sylvie 18 juin 2009. La médecine indienne : fondement et pratiques de l'Ayurveda Editions Eyrolles. 415:354-355.
- ✚ Vernazza C. L., Rabiou B. A., Gibson G. R. (2006) Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: Introduction to Prebiotic. Jhon Wiley & Sons édition. 1-28.
- ✚ Vincent JL, Brealey D, Libert N, Abidi NE, O'Dwyer M, Zacharowski K, 2013. Rapid diagnosis of infection in the critically ill, a multicenter study of molecular detection in bloodstream infections, pneumonia, and sterile site infections. *Crit Care Med.*; 43:2283-91.
- ✚ Viuda-Martos M., Yolanda R.N., Sánchez Z., Fernández-López F., José A. ,2010.
- ✚ Vuorela, S. (2005) Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics.
- ✚ Walbaum S, Dujardin L, (1985): Individual evolution of digestive tract colonization of holoxenic mice by *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 48: 433-438.
- ✚ Wald Elodie ., 2009. le grenadier (*punica granatum*) : plante historique et évolution thérapeutiques récentes. Université Heneri Poincaré-Nancy 1, diplôme d'état de docteur en Pharmacie, 158:22-41.
- ✚ Wade D., Silveira A., Rollins-Smith L., Bergman T., Silberring J., Lankinen H., 2001. Hematological and antifungal properties of temporin A and a cecropin A-temporin A hybrid. *Acta Biochim Pol.* Vol. 48. Pp: 1185 - 1189.



- + Wali .L.D.A.Skiredj et H.Elatier.2003. L'amandie R,l'olivier;le figier,le grenadier Journalle Royaume du Maroc MADER/DERD.Juin. N 105,p 15.
- + Wang , L., Waller, C. L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, Trends in Food Science & Technology . p 300 – 312.2485.
- + Wilcks A., BjarneM.H., HendriksenN.B., LichtT.R., 2006. Fate and effect of ingested Bacillus cereus spores and vegetative cells in the intestinal tract of human-flora-associated rats: FEMS Immunology and Medical Microbiology journal,Volume 46,Issue1 Pp :70-77.
- + Wilson M. (2005) Microbial inhabitants of humans. Cambridge university press 14, 255-266, 295.
- + Yagupsky P (2006) Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. Pediatr.Infect. Dis. J. **25**: 974-976
- + Yazigi Amal, Gaborit Bénédicte, Nogueira Juan Patricio, Butiler Maria-Elena, Andreelli Fabrizio (2008) Rôle de la flore intestinal dans l'insulinorésistance et l'obésité. La Presse Médicale 37, 1427-1430.
- + Zeghad N. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêts économiques (Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis) et évaluation de leur activité antibactérienne. **2009**. Mémoire de Magister.Université de Constantine.
- + Zhang XY, Tanaka T, Betsumiya Y, Kusano R.2009. Association of tannins and related polyphenols with the peptide gramicidins. Chem. Pharm. Bull. 2 50 (2): 258-62.
- + Zhu M., Phillipson J.D., Greengrass P.M., Bowery N.E., Cai Y. 1997. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein. Phytochem., 44 : 441-447.
- + Ziane,M.,2015. Caractérisation, identification et étude de la thermorésistance de souches de Bacillus cereus isolées de semoule de couscous, these de doctorat en microbiologie,Pp 07,Tlemcen.

Annexes





Tests phytochimiques préliminaires des extraits polyphénoliques

1-Les Alcaloïdes

La poudre des extraits obtenus (10 g) de chaque plante est mise dans un erlenmeyer de 250 ml+ 50 ml de H₂SO₄ diluée au 1/10 (50 ml). Ensuite une agitation et macération pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire est faite. Enfin une filtration sur papier lavé à l'eau distillée est appliquée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat.

Réactions de caractérisation

- 1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER (5 g de KI et 1,358 g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée), s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes. (Précipité blanc-jaunâtre)

Les Dérivés Anthracéniques: y compris les quinones et les anthraquinones

-Extrait chloroformique : A 1 g de l'extrait en poudre, on ajoute 10 ml de chloroforme et on chauffe au bain-marie pendant 3 mn, puis on filtre à chaud et on complète à 10 ml si nécessaire.

-Hydrolysât : A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, on rajoute 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré, on doit maintenir le tube à essai dans le bain-marie bouillant pendant 15 mn. Ensuite on refroidit sous un courant d'eau et on filtre. Enfin on complète à 10 ml avec l'eau distillée.

Dérivés anthracéniques libres

1 ml d'extrait chloroformique + 1 ml de NH₄OH dilué puis agitation; la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

Dérivés anthracéniques combinés

Hétérosides

Prélever 5 ml d'hydrolysât et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH₄OH dilué. Agiter, la présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

a-C-hétérosides

Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O - hétérosides par 10 ml d'eau distillée et ajouter 1 ml de FeCl₃ à 10%. Maintenir le tube à essai dans un bain-marie bouillant pendant 30 mn, refroidir et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase chloroformique dans un tube à essai. Ajouter 1 ml de NH₄OH dilué et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides.



1-Flavonoïdes (Anthocyanes)

A 5 ml d'infusé à 5% présentant une coloration plus ou moins foncée ; ajouter 5 ml d'acide sulfurique puis 5 ml de NH_4OH . Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure la présence d'anthocyane.

2-Tanins

La préparation de l'infusé : l'extrait sec (5 g) dans de l'eau distillée bouillante (100 ml) contenue dans un erlenmeyer de 250 ml puis infusion pendant 15 mn (infusé à 5%). A 30 ml d'infusé à 5%, nous avons ajouté 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40% plus 5 ml HCl concentré) et chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 mn. L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques. Filtrer et saturer le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1 ml d'une solution de FeCl_3 à 1%. Le développement d'une teinte bleu noire indique la présence de tanins non précipités par le réactif de Stiasny : ce sont les tanins galliques.

3-Saponosides

Elle se fait sur le décocté à 10% de la drogue. Dans une série de 10 tubes à essai de $160 \times 16\text{mm}$, répartir 1, 2, ..., 10ml d'extrait et ajuster le volume à 10 ml dans chaque tube. Agiter ensuite dans le sens de la longueur pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde, laisser reposer 15 mn et mesurer la hauteur de la mousse dans chaque tube. Celui (X) dans lequel la hauteur fait 1cm indique la valeur de l'indice de mousse.

Réactifs et réactions de caractérisation des tests phytochimiques

Réactif de Wagner :

Dans 75 ml d'eau distillée dissoudre 2g de KI et 1.27g de I_2 , le volume obtenu est ajusté à 100ml

Réactif de Mayer : Dissoudre 1.358 g d' HgCl_2 dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.

Réaction de Libermann Burchardt

Mélanger 5 ml de la solution à tester avec 5 ml d'Anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentrée. Agiter et laisser la solution reposer 30 min à 21°C . Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert.

Réaction de Borntrger

En milieu alcalin aqueux (NH_4OH), les anthracénosides et emodols donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

Réactif d'amidon

Dissoudre 1.2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2.5g d'iodure de potassium. chauffer, dans un bain mari 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition. L'apparition d'une couleur bleue violacée révèle la présence d'amidon.

