

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en

Biologie

Option : *Microbiologie Fondamentale et Appliquée*

Thème

**Etude quantitative des polyphénols et le pouvoir
antibactérien des extraits de l'écorce de fruit de grenadier
(*Punica granatum L.*)**

Présenté par :

Mm. Bdoudjenah Meryem (ep : Benmssehel)

Mlle. Merzouge Linda

Soutenue le 04/07/2016

devant le jury :

Mr CHADLI . R	MCB à l'université de Mostaganem	Encadreur
MrMEKHALDIA	Pr à l'université de Mostaganem	Examineur
MrBEKADDA. A	MCA à l'université de Mostaganem	Président

Année universitaire 2015-2016

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à :

Mes chers parents (Abdelkader, Freha)

Mes sœurs (Alia, Farida)

Mes chers frères (Mohamed, Affif, Samir, Farid, Maamer, Hakim, Ali)

Mes tantes : Meryem et Aicha

A tous mes amis ; Salima, Amina, Nouno, Imen, Fatima, Souria, Djamila, Hayat,
Meryem et Salah

Et tous promotion Microbiologie fondamental et appliquée 2016 pour leur soutien leur compréhension, grâce auxquels j'ai pu obtenir le fruit de toutes ces longues années sans jamais perdre l'espoir.

A tous ceux qui m'aiment

Linda Merzoug



Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à :

A tous qui m'aident durant mes recherches : premier personne et avant tout c'est mon marie Brahim, et à ma belle-mère Fatima ; ma belle-sœur Hafsa, mes belles-frères Mohamed et Hicham

Mes chers parents Tayeb, et Fatima

Mes sœurs et à mes chers frères : Amin, Kheira, Djahida, Amina, Hadjer, Assia, Abd Nour, et enfin mon petit frère Zakarya.

A mes tantes et mes oncles

Sans oublier mes chers grands pères : Abd el Kader, Mohamed, Khadîdja, et Mama.

Et tous promotion Microbiologie fondamental et appliquée 2016 pour leur soutien leur compréhension, grâce auxquels j'ai pu obtenir le fruit de toutes ces longues années sans jamais perdre l'espoir.

A tous ceux qui m'aiment

Boudjenah Meriem



Remerciements

Avant tout chose, nous remercier "ALLAH" qui m'a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire

Pais et salut sur notre éducateur le prophète Mouhemed Pour ce qu'il a donné à l'humanité

*Nous tiens aussi à présenter mes sincères remerciements à Notre encadreur **Dr Chaadli Rabah** pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant cet encadrement*

*Nous remercions **Dr Bouzouina Mohamed** d'avoir accepté d'honorer par sa présence, la présidence du jury de soutenance et pour son encouragement, ses conseils et son aide*

*Nous remercions **Dr Benkada** qui a bien voulu accepter d'examiner ce modeste travail*

*Nous tiens aussi à remercier **Monsieur Marih Salah** pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, et pour ses conseils*

*Nous tiens remercier **Dr yahla Houari** pour sa disponibilité et son aide.*

*Nous remercions **Mme Zeroug Amina** pour son aide et ses critiques, ses suggestion et surtout pour sa patience dans la correction de ce travail*

Nous voudrais remercier les techniciens du laboratoire de microbiologie et biochimie

***Fatima, Mouhem, Djilali, Radouen, Mohammad, Nadia, Souane, Hafida** pour leurs patiences, leurs aides précieuses et leurs valeurs conseils.*

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci

Résumé

Depuis son existence sur terre, l'homme reconnaissait et utilisait les plantes pour sa nutrition ainsi que pour traiter diverses maladies

.Le grenadier "*Punica granatum L.*" est un arbre de la famille des Punicacée. La grenade est très appréciée pour ses nombreuses vertus, notamment au niveau cardiovasculaire. Riche en vitamine C et en antioxydants, elle est tonifiante et peut être consommée sous la forme de fruit frais ou transformée en jus.

Les extraits naturels des plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques

Etude expérimentale pour déterminer les composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux utilisant spectrophotomètre d'une part et d'autre part une étude sur l'activité antibactérien .par méthodes antibiogramme

Les rendements des différents extraits des écorces de *Punica granatum L.* obtenus sont : 23.38 g pour l'extrait méthanoïque brute et 10.93g pour l'extrait méthanol aqueux.

La teneur totale en composé phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de (402.26 µg/ml) et (364.90 µg/ml) dans les extraits méthanoïques et méthanol aqueux de l'écorce du *Punica granatum L.*, respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode de chlorure d'aluminium (AlCl₃), leur teneur est de (1.258 µg/ml) et (1.597 µg/ml) dans les deux extraits méthanol aqueux et méthanoïque respectivement.

L'extrait méthanoïque de l'écorce de *Punica granatum* a représenté une teneur plus élevés en polyphénol et en flavonoïdes par rapport à l'extrait méthanol aqueux.

Les antibiotiques utilisés dans notre expérimentation ont tous montré une réponse positive. La Nitroxoline a montré une efficacité d'inhibition dont la zone est de 20 mm de diamètre avec *Escherichia coli* et la Streptomycine et pénicilline G, la zone d'inhibition a été de 15 mm avec les *Staphylococcus aureus* et enfin la Streptomycine a monté un diamètre de 17mm avec *Pseudomonas aeruginosa* .L'extrait méthanoïque a montré une activité antimicrobienne considérable contre les trois souches bactériennes testées par rapport à l'extrait méthanol aqueux pour des doses qui varient entre 50mg et 100mg. L'évaluation du pouvoir antimicrobien des deux extraits par les deux méthodes de diffusion des puits et des disques dans un milieu solide, a montré que les deux extraits possèdent un pouvoir antimicrobien sur toutes les souches testées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

.Mots clés : *Punica granatum L.*, *Activité antimicrobienne Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, polyphénols, *Pseudomonas aeruginosa*. Polyphénols, flavonoïdes.

الملخص:

منذ وجودها على الأرض، استخدم الإنسان النباتات للتغذية ولعلاج الأمراض المختلفة.

الرمان "*Punica granatum L*" شجرة من عائلة *Punicacée*. ان الرمان هو محل تقدير كبير لاحتوائه على فضائل كثيرة، خصوصا على مستوى أنظمة القلب والأوعية الدموية. فهو غني بالفيتامين C ومضادات الأكسدة، يعتبر منشطا ويمكن تناوله كفاكهة طازجة أو كعصير.

المستخلصات الطبيعية من النباتات تحتوي على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية التي تم تعيينها لأنشطة بيولوجية مختلفة.

دراسة تجريبية لتحديد مجموع المركبات الفينولية ومجموع فلافونيدات باستخدام المضاء الطيفي *spectrophotomètre* ومن جهة أخرى دراسة عن النشاط المضاد للبكتيريا. بواسطة طرق *antibiogramme*

المردود الذي تم الحصول عليه من مختلف المستخلصات من لحاء الرمان "*Punica granatum L*": 23.38 غ لمستخلص الميثانول الخام و10.93 غ لمستخلص الميثانول المائي.

تم تحديد المحتوى الكلي للمركب الفينولي باستخدام الكاشف *Folin-Ciocalteu*، بنسب (402.26 ميكروغ / مل) و(364.90 ميكروغ / مل) في مستخلصات الميثانول والميثانول المائي من لحاء الرمان "*Punica granatum L*" التوالي. تم تقييم فلافونيدات باستخدام أسلوب كلوريد الألومنيوم (3 AICI) ومضمونها هو (1.258 ميكروغرام / مل) و (1.597 ميكروغرام / مل) في كل من مستخلصات الميثانول المائي والميثانول على التوالي.

مستخلص الميثانول من لحاء الرمان يظهر محتوى عالي من البوليفينول والفلافونيدات مقارنة بمستخلص الميثانول المائي.

وأظهرت المضادات الحيوية المستخدمة في تجاربنا استجابة إيجابية. فقد أعطى النيتروكسولين *Nitroxoline* كفاءة تثبيطية حيث أن قطر المنطقة بلغ 20 ملم مع *Escherichia coli* القولونية والسربتومايسين والبنسلين G، و بلغ 15 مم مع المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* وأخيرا أظهرت الستيرتوميسين قطر 17 مم مع الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*.

مستخلص الميثانول أظهر نشاط كبير مضاد للميكروبات ضد السلالات الثلاثة البكتيرية التي تم اختبارها مقارنة فيما يتعلق بمستخلص الميثانول المائي في الجرعات التي تختلف بين 50 مغ و 100 مغ. تقييم فاعلية مضادات الميكروبات لكل من المستخلصين بإتباع طريقتي نشر الأبار والأقراص في وسط صلب، أظهر أن كلا المستخلصين يمتلك قوة مضادة للميكروبات على جميع السلالات المختبرة (الإشريشيا القولونية، المكورات العنقودية الذهبية، الزائفة الزنجارية).

الكلمات المفتاحية : الرمان *Punica granatum L*، نشاط مضادات الميكروبات لاشريشيا القولونية، المكورات العنقودية الذهبية، الزائفة الزنجارية. البوليفينول، الفلافونويد.

Liste des tableaux

Tableau 1 : représente les différentes vitamines de la grenade	29
Tableau 2 : Préparation des dilutions	37
Tableau 3 : les antibiotiques utilisés	41
Tableau 4 : Tableau récapitulatif regroupant le rendement et la couleur des lyophilisats de l'écorce des fruits de <i>Punicagranatum L</i>	53
Tableau 5 : Les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents antibiotiques	56
Tableau 6 : L'action d'inhibition des différents antibiotiques	56
Tableau 7 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents extraits (50 mg/ml)....	56
Tableau 8 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents extraits (80mg/ml)....	57
Tableau 9: les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents extraits (100 mg/ml)....	57
Tableau 10 : Influence de l'extrait méthanol pur de différentes concentrations de l'écorce de <i>Punica granatum .L</i> (méthode de puit).....	57
Tableau11 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes concentrations de l'extraits méthanol aqueux de l'écorce de <i>Punica granatum .L</i> (méthode de puit).....	58
Tableau 12 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes concentrations de l'extraits méthanol pur de l'écorce de <i>Punica granatum.L</i> (méthode de disque).....	58
Tableau 13 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes concentrations de l'extraits méthanol aqueux de <i>Punica granatum .L</i> (méthode de disque).....	59

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique des acides hydroxybenzoïques.....	06
Figure 2 : Structure chimique des acides hydroxycinnamiques	06
Figure 3 : squelette de base des flavonoïdes	08
Figure 4 : base des flavonoïdes	10
Figure 5 : base des anthocyanes.....	10
Figure 6 : Structure chimique de l'acide ellagique.....	11
Figure 7 : Structure chimique des ellagitannins.....	11
Figure 8 : Aspect des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figure 9 : Aspect des colonies d' <i>Escherichia coli</i>	15
Figure 10 : Aspect des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Figure 11 : Fleurs et fruits du Grenadier (<i>Punica granatum</i>)	25
Figure 12 : Feuilles lancéolées et fruit de <i>Punica granatum</i>	27
Figure 13 : Les fleurs de la grenade	27
Figure 14 : présentation des grains de <i>Punica granatum</i>	28
Figure 15 : L'écorce de <i>Punica granatum</i>	29
Figure 16 : Vue générale d'un grenadier (Photo originale)	33
Figure 17 : Pesée et préparation de la drogue végétale (Photo originale).....	34
Figure 18 : Matériel utilisé pour la méthode Soxhlet.....	35
Figure 19 : Matériel utilisé pour la méthode d'agitation.....	36
Figure 20 : Préparation des dilutions.....	38
Figure 21 : Les trois souches bactériennes	39
Figure 22 : Coloration de Gram	41
Figure 23 : Diffusion sur milieu gélosé par la méthode des disques	43
Figure 24 : Diffusion sur milieu gélosé par la méthode des puits ou cylindre	44
Figure 25 : Marquage de la boîte.....	45
Figure 26 : Rendements en lyophilisats (A : Méthanol pur, B : Méthanol aqueux) d'écorce de Fruitsde <i>Punica granatum</i> L.....	46
Figure 27 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	46
Figure 28 : Concentrations (mg/ml) des lyophilisats	48
Figure 29 : Teneurs de la matière sèche en composés phénoliques totaux.....	48
Figure 30 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	49

Figure 31 : Concentrations (mg/ml) des lyophilisats en flavonoïdes totaux.	49
Figure 32 : Teneurs de la matière sèche en flavonoïdes totaux.....	50
Figure 33 :Aspect microscopique d'E. coli G (x100)	51
Figure 34 :Aspect microscopique de Staphylococcus aureus G(x100)	52
Figure 35 : Aspect microscopique de Pseudomonas aeruginosa G(x100)	54
Figure 36 : Sensibilité d' <i>Escherichiacoli</i> aux différents antibiotiques.....	54
Figure37 : Sensibilitéde <i>staphylococcus aureus</i> aux différents antibiotique.....	54
Figure 38 : Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux différents antibiotiques.....	57
Figure 39 :l'effet antibactérien des différentes concentrations de l'extrait méthanol pur l'écorce de <i>Punica granatum L.</i> (méthode de puit).....	58
Figure 40 :l'effet antibactérien des différentes concentrations de l'extrait méthanol aqueux de l'écorce de <i>Punica granatum L.</i> (méthode de puit).....	58
Figure 41 :l'effet antibactérien des différentes concentrations de l'extrait méthanol pur de l'écorce de <i>Punica granatum L.</i> (méthode de disque).....	58
Figure 42 : l'effet antibactérien des différentes concentrations de l'extrait méthanol aqueux de l'écorce de <i>Punica granatum L.</i> (méthode de disque).....	59

C6-C3 : Acide cinnamique.

UV : ultra violet.

UDP-G : Uridine Diphosphate- Glucose.

TDA : Tryptophane désaminas.

ONPG : Orthonitrophenol-Galactose.

LDC : Lysine-décarboxylase.

ODC : Ornithine-décarboxylase.

Adh : Arginine-dehydrogynase.

PSA : Prostate specific antigen.

Na₂CO₃ : carbonate de sodium.

GAE : Acide gallique.

MH : Mueller Hinton

Introduction.....01
Synthèse bibliographique

Chapitre I : la phytothérapie

I- Introduction.....02
II- Historique.....02
III- Les différentes méthodes de préparation des plantes médicinales.....03
 III-1- L'infusion03
 III-2- La décoction.....03
 III- 3- La macération.....03
 III- 4- Le suc.....03
 III-5- Les compresses et les cataplasmes03

Chapitre II : les composés phénolique

I- Les composés phénoliques05
 I-1- Les acides phénoliques.....05
 I-2- Biosynthèse.....06
II- Les Flavonoïdes.....07
 II-1- Généralités.....07
 II-2- Distribution.....07
 II-3- Biosynthèse.....07
 II-4- Structure.....08
 II-5- Classification.....08
 II-6- Les anthocyanes.....09
 II-7- Les flavones et flavonole.....09
III- Les tannins.....10

Chapitre III les souches testées

I- <i>Staphylocoques aureus</i>	12
I-1- Généralités	12
I-2- Classification	13
I-3- Habitat	13
I-4- Caractères morphologiques et cultureux	13
I-5- Caractères biochimiques	13
I-6 - Mode de transmission	14
I-7- Pouvoir pathogène cutané	14
II- <i>Escherichia coli</i>	15
II-1- Généralités	15
II-2- Classification	16
II-3- Habitat	16
II-4- Caractéristiques morphologiques et culturelles	16
II-5- Caractéristiques biochimiques	17
II-6- Mode de transmission	17
II-7- Pouvoir pathogène	17
III- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18

III-1-Généralité.....	18
III-2-Classification.....	18
III-4- Habitat	19
III-5- Caractéristiques morphologiques et culturelles.....	19
III-6- Caractéristiques biochimiques.....	20
III-7- Mode de transmission.....	20
III-8- Pouvoir pathogène	21

Chapitre IV : le grenadier

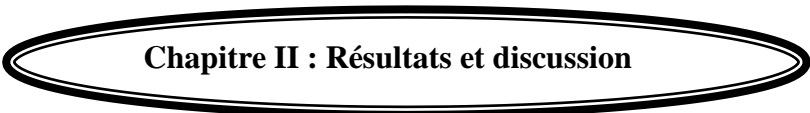
I-Introduction.....	22
II-Histoire de grenadier.....	22
III- La grenade dans les civilisations.....	23
III.1. Mythologie grecque.....	23
III.2. Mention dans la Bible.....	23
III.3. Mention dans le Coran.....	23
III.4. Aire de répartition.....	24
IV- Grenadier dans le règne végétal.....	24
IV-1- Nomenclature du <i>Punica granatum</i>	25
IV-2- Classification du <i>Punica granatum</i>	26
V- Botanique.....	26
V-1- Biologie du grenadier.....	26
Description générale du grenadier.....	26
a. Les feuilles.....	26
b. Les fleurs.....	27
V-2- Graines.....	28
V-3- Ecorces.....	28
V-4- Valeur nutritionnelle.....	29
VI-Propriétés thérapeutiques des grenades (<i>Punica granatum L.</i>)	30
VI.1. Propriétés antioxydants	30
VI-2-Activité anti-inflammatoire	31

VI-3- Activité antidiabétique.....	31
VI-4-Action anticancéreuse.....	31
VI-5-Action antimicrobienne.....	32

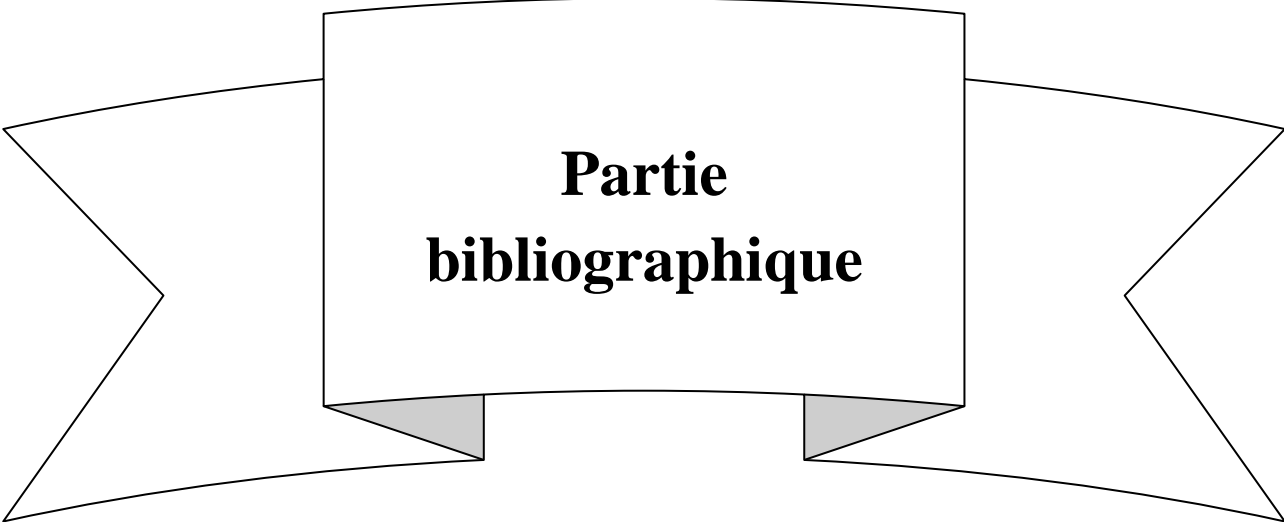
Partie expérimental

Chapitre I : Matériels et méthodes

I- Matériels et méthodes.....	33
1- Problématique.....	33
I-2- Objectifs	33
I- 3- Matériel végétal et site d'échantillonnage.....	33
I-4- Méthodes.....	34
I-4-1- Préparation de la drogue végétale.....	34
I-4-2- Préparation des extraits.....	34
I-4-2-1- Méthode de Soxhlet	34
I-4-2-1- Méthode d'agitation.....	35
I-5- Détermination des composés phénoliques totaux	36
I-6- Détermination des flavonoïdes totaux.....	37
I-7- Test antimicrobien.....	37
I-7-1- Préparation des dilutions des extraits	37
I-7-2- Les Souches bactériennes.....	38
I-8- Identification des souches bactériennes.....	39
I-8- 1- Etude microbiologique.....	39
I-8-2- Examen macroscopique	39
I-8-3- Examen microscopique.....	40
I-8-3-1- Coloration de G.....	40
• Principe.....	40
• Technique.....	40
• Coloration.....	40
• Lecture.....	40

I-9- Etude de l'activité antibactérienne des différents extraits	41
I-9- 1- Technique d'antibiogramme	41
• Application des disques d'antibiotiques.....	41
• Lecture.....	41
• Les antibiotique utilisé	42
I-9-2-Application sur les souches bactériennes.....	42
I-9-2-1- Préparation de disques d'antibiogramme.....	42
I-9-2-2- Préparation d'inoculum	42
I-9-2-3- Diffusion sur milieu gélosé par la méthode des disques	42
• Technique	43
I-9-2-4- Diffusion sur milieu gélosé par la méthode des puits ou cylindre.....	43
• Préparation des boîtes	44
• Dépôts des extraits	44
• Marquage de la boîte	44
	
I. Résultats et discussion.....	46
II.1. Rendement.....	46
II.2. Etude spectrophotométrique (Dosages)	46
II.2.1. Les composés phénoliques totaux.....	47
II.2.2. Les flavonoïdes totaux.....	49
II.3. Etude microbiologique <i>in vitro</i>.....	51
II.3.1. Identification physiologiques et biochimiques.....	51
II.3.2. Test d'antibiogramme.....	53
II.3.3. Activité antibactérienne des extraits.....	55
II.3.4.1.Méthode de puits.....	57

I II.3.3.1.b.Extrait Méthanol aqueux.....	57
I.3.4.1.a.Extrait méthanol pur.....	57
II.3.3.2.Méthode de disque.....	58
II.3.4.1.a.Extrait méthanol.....	58
II.3.3.1.b.Extrait Méthanol aqueux.....	59
Conclusion	60
Les références bibliographique.....	61
Annexes	



**Partie
bibliographique**

Dicton

*Autrefois, les conteurs orientaux posaient des devinettes
au cours des soirées au clair de lune.*

*Le conteur s'écriait : « Je ne suis ni roi, ni reine, je
porte la couronne, qui suis-je ? »*

*Et devant le silence perplexe de l'assistance, il tonitruait :
« C'est la grenade ! »*



Introduction

Ces dernières années, les plantes médicinales ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine thérapeutique. En effet, les substances naturelles extraites de ces plantes ont permis de grandes avancées en raison de leur valeur ajoutée dans la préparation de nombreux produits en particulier dans les domaines pharmaceutique, la cosmétique et les parfums. Les enjeux politiques, économiques, sociétaux, et environnementaux incitent également les industriels à innover sur le plan technologique et à améliorer l'efficacité énergétique et environnementale de leurs procédés, grâce au développement d'une chimie dite verte en remplacement des procédés chimiques traditionnels.

Les techniques traditionnelles d'extraction de ces substances naturelles à partir des plantes nécessitent d'importantes adaptations afin de réduire les risques pour la santé, la sécurité et l'environnement. En conséquence, la recherche de produits et de procédés alternatifs plus respectueux de l'homme et de son environnement occupent une place primordiale en recherche et développement, y compris en ce qui concerne des opérations unitaires du génie chimique avec les technologies séparatives associées, telle que l'extraction plante-solvant. Pour répondre aux besoins des différentes industries qui doivent satisfaire à la fois les demandes économiques changeantes et le respect de l'environnement tout en restant mondialement compétitives, des approches scientifiques modernes du génie chimique et des procédés ont vu le jour.

Pour la présente étude, le choix s'est porté sur une espèce commune, le grenadier (*Punica granatum* L.) et pour se faire, un plan en trois chapitres est proposé :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui donnera un aperçu sur la phytothérapie, les polyphénols, la pathologie bactérienne et une présentation détaillée sur l'espèce utilisée, ainsi que les techniques d'extraction conventionnelles. Dans le second chapitre, nous détaillerons le matériel et les méthodes employés et nous décrirons les moyens d'analyses et des extraits obtenus. Le troisième chapitre présentera les résultats obtenus relatifs à l'identification des compositions chimiques des Polyphénols, leurs dosages et les activités biologiques. Cette s'achèvera par une discussion des résultats obtenus, suivi d'une conclusion.



Chapitre I :
La phytothérapie

I- Introduction

Depuis son existence sur terre, l'homme reconnaissait et utilisait les plantes pour sa nutrition ainsi que pour traiter diverses maladies.

Au cours de ces dernières années, les résultats des recherches conduites par les spécialistes (Médecins, biologistes, chimistes, ethnologues, botanistes, agronomes, écologistes, économistes) concourent à démontrer les effets néfastes des médicaments à base des produits chimiques pour l'organisme de l'être humain et l'importance et l'efficacité des plantes médicinales et des produits provenant de l'agriculture biologique.

Les plantes médicinales et les produits biologiques : fruits, légumes, huile d'olive... constituent un véritable trésor de santé, de dynamique et de beauté pour l'organisme de l'être humain. Ces produits naturels sont très demandés à travers le monde, dont il est temps de multiplier, par l'application des résultats des recherches scientifiques et des techniques appropriées de production, de protection, de conservation et d'exploitation rationnelles (**Sassi, 2008**).

II- Historique

En Occident, dans la Grèce antique, Hippocrate (460-377 av. J-C.) Surnommé le père de la médecine recommandait déjà beaucoup de plantes pour leurs vertus diurétiques.

Un autre médecin grec, Dioscoride, établit le premier herbier des plantes médicinales. Traduit en arabe et persan, ce traité sera utilisé quelque siècles plus tard par les savants musulmans, qui influenceront les grandes universités de l'époque, notamment celle de Montpellier ; le centre européen le plus réputé en botanique (**Iserin, 2001**).

Grace aux échanges avec l'Afrique et l'Asie, la pharmacopée végétale occidentale va s'enrichir de nombreuse plantes et épices exotiques. On y trouvera désormais camphre, gingembre, cannelle, noix de muscade, santal, curcuma et ginseng.

Qu'il s'agisse de plantes locales ou de végétaux d'origine plus lointaine, leur usage sera longtemps basé sur croyances plus ou moins fantaisistes. Pendant tout le Moyen Age, superstition, magie et observations empirique s'entremêlent dans la thérapeutique par les plantes. A partir de la renaissance, la science, pour la première fois, rejeter les élixirs d'alchimistes et autres remèdes magiques. Les plantes locales, soigneusement récoltées, sont largement employée sous forme de tisane, de décoction ou d'onguent : elles constituent l'essentiel des traitements dont on dispose pour se soigner, selon des formules transmises par la tradition (**Iserin, 2001**).

III- Les différentes méthodes de préparation des plantes médicinales

L'utilisation des plantes médicinales, quel que soit le principe de la préparation des essences à base des plantes médicinales ou à partir de l'utilisation directe, est différente selon le principe actif ainsi que la maladie souhaitant traitée (**Sassi, 2008**).

III-1- L'infusion

Elle consiste à verser de l'eau bouillante sur des plantes au moment précis, ou l'eau entre en ébullition. Il faut alors couvrir le récipient et laisser infuser le temps nécessaire (de dix minutes à une heure selon les plantes) (**Sassi, 2008**).

III-2- La décoction

Il s'agit de faire bouillir l'eau dans laquelle on a mis les plantes. Le temps d'ébullition va de 10 minutes à une heure selon la (ou les) plante (s).

III- 3- La macération

Les plantes sont trempées dans un liquide (eau, alcool, huile, miel, vin, vinaigre etc...) pendant une période d'au moins 15 jours. Les préparations obtenues sont un peu plus compliquées mais se gardent plus longtemps. On peut donc toujours en avoir sous-main (**Lacoste, 2011**).

III- 4- Le suc

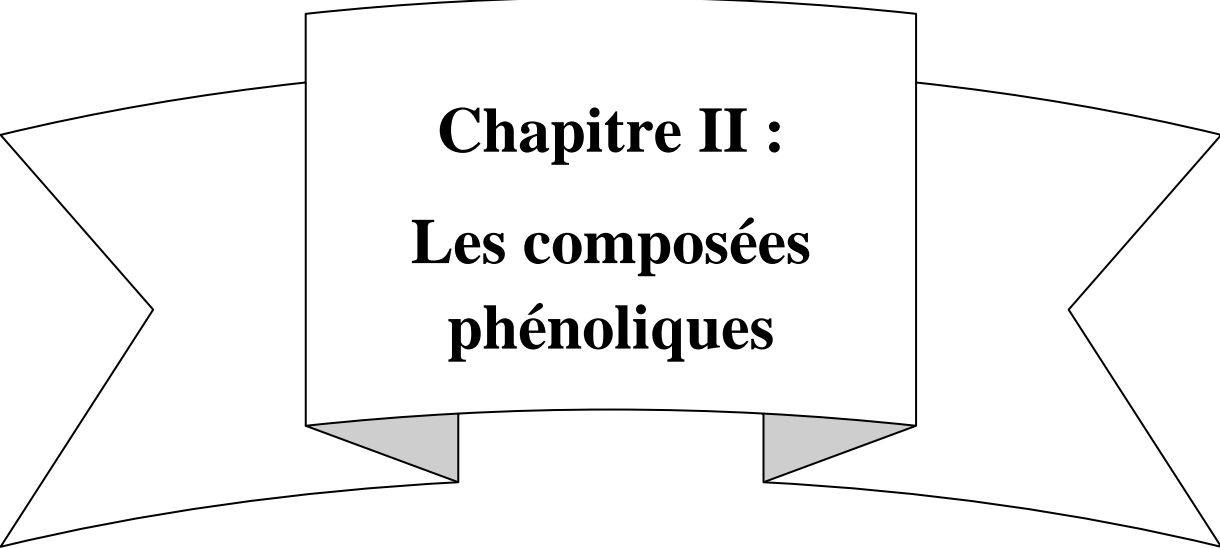
Il suffit de réduire la plante en purée. Il est préférable de le faire avec des plantes fraîches, mais parfois quand la plante est trop épaisse ou donne peu de jus. Il est nécessaire de la cuire dans un peu d'eau. Une fois la purée de pulpe obtenue est filtrée, le suc est bu dilué dans un peu d'eau ou utilisé en compresse. Cette méthode est rarement employé, car le produit obtenu est souvent très amer et ne se conserve pas (**Herisset, 1974**).

III-5- Les compresses et les cataplasmes

Compresses et cataplasmes sont principalement utilisés dans les cas de problèmes de peau, les entorses, les fractures, et les douleurs musculaires ou articulaires.

La phytothérapie a pris son origine de puis l'ancien temps ainsi les textes et les traces historiques nous ont prouvé cette utilisation. Depuis, elle a évolué par le développement intellectuel de l'homme et elle s'est transformée d'une utilisation ethnique, d'où l'ethnoécologie vers une utilisation ethno-pharmacologique, avec la découverte des molécules et de leurs activités biologiques qui a validé l'utilisation traditionnelle de ces plantes dans la plus part des temps, et qui a corrigé des fois la mauvaise utilisation de ses vertus.

Dans le chapitre qui va suivre, on va discuter une famille ainsi que les molécules intéressantes dans la pharmacognosie et qui ont prouvé leurs pouvoirs médicamenteux (**Sassi, 2008**).



Chapitre II :
Les composées
phénoliques

I- Les composés phénoliques

Les composés phénoliques appartiennent à la classe des métabolites secondaires des végétaux. Ils interviennent dans la défense des plantes contre les agressions environnementales (**Gee et Johnson, 2001**). En effet, de nombreuses fonctions peuvent être attribuées à ses molécules, ils peuvent résister aux diverses agressions des organismes pathogènes, ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux aux divers stress et jouent le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie) et entre les plantes et les symbioses (**Macheix et al., 2005**).

Ils correspondent à une grande variété de substances les plus hétérogènes, les plus nombreuses et les plus distribuées dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Wollgast et Anklam, 2000 ; Bruneton, 2009**). Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles libres ou engagées dans une fonction ester, éther ou hétéroside (**Urquiaga et Leighton, 2000**). Ceux présents sous forme de glucosides sont les constituants des végétaux supérieurs les très largement répandus (**Tanguy, 1971 ; Brzozowska et al., 1971**). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Macheix et al., 2005**). Le ou les noyaux aromatiques peuvent être produits soit par la voie des shikimates (**Kening et al., 1995**), la voie de l'acétate (**Bruneton, 2009**), ou bien de l'association des deux ; la voie des phénylpropanoïdes (**Hoffmann et al., 2004**) induit la synthèse de composés mixtes (**Bruneton, 1999**). Les composés phénoliques regroupent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthonés (**Stalikas, 2007**). Dans cette classe de métabolites secondaires, se trouvent de nombreux composés, qui peuvent être classés selon leurs structures :

I-1- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques constituent les formes les plus simples des composés phénoliques. Ils se divisent en deux classes : celle qui dérive de l'acide benzoïque avec une structure (C6-C3 ou C6-C1) et celle qui dérive de l'acide cinnamique (C6-C3) (**Hollman, 2001**).

La concentration de l'acide hydroxy-benzoïque des plantes comestibles est généralement très faible, à l'exception de certains fruits rouges, le radis noir et les oignons, qui peuvent avoir des concentrations de plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de matière fraîche. Le thé est une source importante d'acide gallique, les feuilles peuvent contenir jusqu'à 4,5 gramme par kilogramme de matière fraîche. Cependant, les acides hydroxy-cinnamiques

I-2- Biosynthèse

A partir du phosphoénol-pyruvate et l'érythrose 4-phosphate, l'aldocondensation et la déshydratation de ce dernier conduisent au déshydroshikimate, qui est réduit au shikimate à l'aide du NADH₂. L'acide shikimique produit réagit ensuite avec le phosphoénol-pyruvate, qui suite aux réactions de phosphorylation, déshydratation, déshydrogénation, décarboxylation et amination forment la phénylalanine ; précurseur de la synthèse des phénols (**Richter, 1993 ; Dewick, 2002**).

Dans le genre Citrus, les acides phénoliques dérivent essentiellement de l'acidehydrocinnamique (**King et Young, 1999**). Les concentrations des acides phénoliques (acide férulique, acide sinapique, acide p coumarique et acide caféique) sont significativement plus élevées dans la peau des fruits par rapport à la pulpe. L'acide férulique est le composant principal dans la pulpe et la peau suivi l'acide p coumarique, sinapique et l'acide caféique qui représente la concentration la plus faible chez les différentes espèces d'agrumes (**Gorinstein et al., 2004a .Gorinstein et al., 2004b ; Gorinstein et al., 2001**). Contrairement aux orangers et pamplemoussier, les citronniers accumulent des concentrations plus élevées (**Gorinstein et al., 2001**). Par ailleurs, les acides phénoliques qui dérivent de l'acide benzoïque sont moins représentés chez les agrumes. Ainsi, (**Swatsitang et al. 2000**) rapporte la présence, chez Citrus sinensis, des acides galliques, procatéchique, chlorogénique, p hydroxybenzoïque et l'acide vanillique.

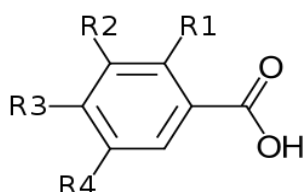


Figure 1: Structure chimique des acides hydroxybenzoïques (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**)

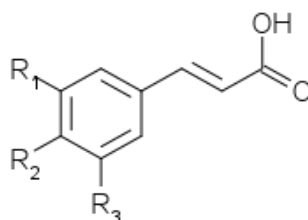


Figure 2: Structure chimique des acides hydroxycinnamiques (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**)

II- Les Flavonoïdes

II-1- Généralités

Le nom flavonoïde provient du terme flavus c'est-à-dire jaune (**Malešev et Kuntić, 2007**). Ils sont largement distribués dans les fruits, les légumes, les jus de fruits, le thé et le vin. Dans les tissus végétaux, les flavonoïdes ont montré de nombreuses fonctions : la protection contre les radiations UV (**Shirley, 1996 ; Rousseaux et al., 1998 ; Gitz et al., 1998**), le rôle des phytoalexines, la protection contre les herbivores et les insectes, rôles des composés chimiques allélopathiques, initiateur de l'interaction symbiotique (**Aoki et al., 2000**), régulation du transport d'auxine et stimulateurs du pollen (**Dixon et Paiva, 1995**).

Les flavonoïdes ont été mis à profit dans l'industrie alimentaire, cosmétologique et en dermatopharmacie. En plus de leurs fonctions biochimiques, physiologiques et écologiques, de nombreux flavonoïdes jouent un rôle de protecteur dans la santé humaine (**Martens et al., 2003**) ; ils sont surtout illustrés en thérapeutiques comme anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antitumoraux et anti-oxydants. Des travaux plus anciens ont montré que les phénols sont associés à des processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la différenciation organogène, la dormance des bourgeons, la floraison et tubérisation (**Heimeur et al., 2004**).

II-2- Distribution

Les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes, puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles des cellules (**Piquemal, 2008**). Ces substances sont présentes dans les différents organes des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (**Verhoeyen et al., 2002**), varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal (**Fritch et Griesbach, 1975**) ou avec l'interaction de la plante avec son environnement (**Boudet, 2000**). Ainsi, certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certaines espèces végétales ; les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes dans les fruits rouges, les flavonols dans les choux, les brocolis, les oignons et le raisin (**Heller et al., 1998**).

II-3- Biosynthèse

Deux classes de gènes codent la voie de biosynthèse des flavonoïdes :

1- Les gènes de structure codent les enzymes, qui interviennent directement dans la synthèse des flavonoïdes ;

2- Les gènes de régulation, qui contrôlent l'expression des gènes de structure (**Schijlen et al., 2004**).

Les flavonoïdes sont formés dans les plantes et sont synthétisés à partir des acides aminés aromatiques, phénylalanine et tyrosine, avec des unités acétates (**Middleton et al., 2000**). La phénylalanine-ammonialyase catalyse la transformation de la L-phénylalanine en acide transcinnamique par désamination, lequel est l'intermédiaire principal dans la biosynthèse des composés phénoliques (**Rivero et al., 2001**). La chalcone synthase catalyse la condensation de trois molécules d'acétates activées (malonyl CoA) avec p-coumaryl CoA pour former la 4,2',4',6' tétrachalcone (**Schijlen, 2004**). Cette chalcone est métabolisée en flavanone (naringénine) sous l'action de la chalcone isomérase. Ces deux formes de naringénine : le chalcone et le flavone sont les précurseurs pour tous les composés phénoliques produits par les plantes.

Le flavone est probablement modifié dans un mode réactionnel en plusieurs dérivés par hydroxylation, méthylation glycosylation et rhamnosylation (**Moringuschi et al., 2003**).

II-4- Structure

Les flavonoïdes présentent tous la même structure de base (Fig. 3), ils sont constitués de 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), répartis sur deux unités aromatiques en C6 (A) et (B) et reliés par une chaîne à 3 carbones formant ainsi l'hétérocycle (C) (**Cook et Samman, 1996 ; Fawe, 1997 ; Werdman et al., 2007**).

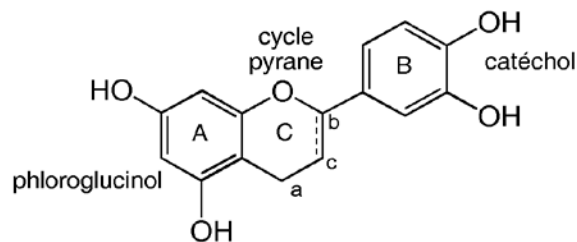


Figure 3 : squelette de base des flavonoïdes. (**Moringuschi et al., 2003**).

II-5- Classification

Comme le laisse supposer, sa dénomination historique (du latin *flavus* = jaune). Ce groupe est très important et très étendu et comprend des composés de couleur jaune. Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques présents dans les végétaux et plus de 4000 différents types de flavonoïdes ont été décrits (**Hollman, 1997**). D'après **Shahidi et Naczk (1995)**, les flavonoïdes appartiennent aux groupes des phénols qui ont un squelette de base diphényle-propane (C₆-C₃-C₆). Avec différent niveau d'oxydation au centre du cycle pyrane est ouvert (Fig. 3), et la plupart des flavonoïdes se trouvent sous forme d'aglycones liés à des glucosides ces constituants glycosidiques

sont fixés aux groupes hydroxyles du cycle A et plus fréquemment a la position 3 de l'hétérocycle **(Richter, 1993)**.

Parmi les flavonoïdes présentant le plus intérêt, nous citerons :

II-6- Les anthocyanes

Se sont des pigments, qui par suite de leur ionisation, présentent des couleurs différentes pour divers pH, de rouge orange en milieu acide au bleu mauve en milieu alcalin ; et dans certain cas forment des complexes avec les métaux **(Richter, 1993)**. Les anthocyanes se trouvent dans la plupart es espèces de plantes et plus de 200 anthocyanes différents ont été identifiés dans les plantes environ 70 dans les fruits (Fig.3).

La plupart des anthocyanes sont des produits comme monoglycosides et diglycosides de pelargonidine, cyanidine, malvidine, et peonidine **(Shahidi et Nacz, 1995)**.

Les anthocyanes dérivent du phenyl-2-benzopyrylium ou flavylium et le cation pyrilium est un ion oxonium dans lequel l'atome d'oxygène tétravalent est chargé positivement ressemblants a une structure qui rappelle celle de l'azote dans les ions ammoniums et dans le cas du pyrilium, alors que le caractère aromatique est du a la présence de double liaisons conjuguées responsables de la stabilité de la molécule **(Aissani et Maata, 1998)**.

Ils sont présents dans la nature sous forme hétérosidiques ou anthocyanidines, cependant le nombre d'aglycones, ou l'anthocyanidines est assez limité **(Ribereau et al, 1968)**.

II-7- Les flavones et flavonoles

Les flavonoles de teinte jaune en générale sont caractérisés par la présence d'un groupement carbonyle en position 4 et d'un groupement glucidique est le plus souvent relié en position 7. Parmi les flavonoles les plus répandus, on trouve essentiellement le quercétol et le myricetol.

Les flavones proprement dices ont un rôle moins important que les flavonoles. Ils se trouvent dans les plantes sous forme *O*-glucoside. La seule différence avec les flavonoles est la présence de groupe hydroxyle en C₃ dans les flavonoles qui peut être considéré comme trois hydroxy flavonole **(Hertog et al., 1992)**.

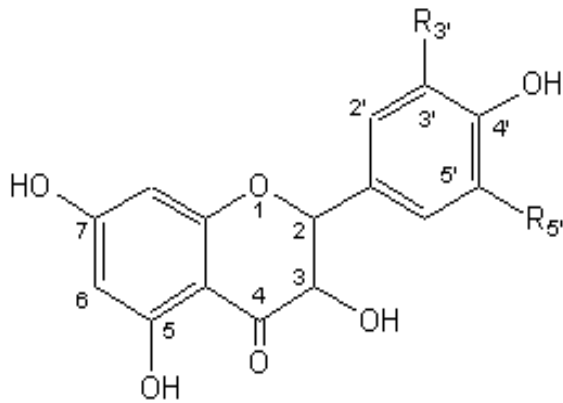


Fig 4: base des flavonoïdes

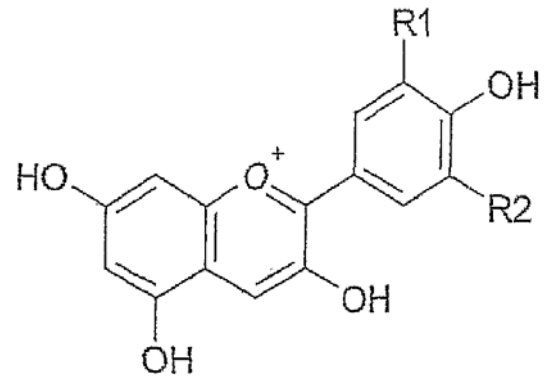


Fig 5 : base des anthocyanes (Richter, 1993)

Hertog et al., 1992).

III- Les tannins

Les tannins représentent le principal groupe des composés phénoliques, avec pas moins de 4000 composés différents dénombrés dans le règne végétal (Aoki et al., 2000). Les tannins forment avec leurs dérivés la quatrième famille de composés par ordre d'abondance dans les plantes après la cellulose, la lignine et les hémicelluloses (Peronny, 2005). Dans l'énorme diversité des tannins végétaux, on distingue essentiellement deux groupes chimiques : les tannins hydrolysables et condensés.

Les tannins hydrolysables sont généralement des esters de glucose que l'on classe en deux catégories : Les gallotannins et les ellagitannins (Fig6). Leur hydrolyse provoque la libération des acides tels que les acides galliques pour les gXallotannins et les acides ellagiques pour les ellagitannins (Muller-Harvey, 2001 ; Kraus et al., 2004). Ils sont synthétisés par la voie de l'acide schikimique, à partir de laquelle découle l'acide gallique suite à une oxydation de l'acide 3-déshydroshikimique. Une gallolylation de l'acide gallique permet d'obtenir le β -glucogalline en présence de l'uridine diphosphate- glucose (UDP-G) qui sera par la suite transformé par addition de nouveaux groupements galloyles en : 1,6 digalloylglucose, 1, 2,6 trigalloylglucose et 1, 2, 3,6 tétragalloylglucose. Les deux types de tannins hydrolysables (les ellagitannins et les gallotannins) sont formés à partir du « 1, 2, 3, 4, 6,- penta- D- galloyl- β -D-glucose » par l'ajout d'un autre groupement galloyle sur le noyau (Grundhofer et al., 2001).

De leur part, les tannins condensés, appelés aussi « proanthocyanidines », ce sont des polymères de flavane-3-ols, et de flavane-3,4-diols. Elles peuvent contenir dans leurs structures de

deux à cinquante unités de flavanoïdes (**Xie et Dixon, 2005 ; Takos et al., 2006**). Leurs poids moléculaires se situent entre 5000 et 12000 daltons (**Kouki et Manetas, 2002**).

Les proanthocyanidines se caractérisent par une variation structurale considérable (**Schofield et al, 2001; Xie et Dixon, 2005**). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques. On distingue ainsi : la catéchine, l'épicatéchine, l'épicatéchine gallate et l'épigallocatechine (Fig7). Les unités monomériques sont reliées entre eux par une liaison entre le carbone 8 et le carbone 4 (C 8 - C 4) (**Schofield et al., 2001**). Selon le nombre d'unités monomériques et le type de liaisons qui les reliant entre-elles, les tannins condensés peuvent être classés en : procyanidine, prodelphinidine, profisetinidine, prorobinetinidine (**Xie et Dixon, 2005**).

La biosynthèse des tannins condensés commence par l'action du flavanones 3-hydroxylase qui catalyse la transformation des flavanones en dihydroflavonols, suivi des dihydroflavonols réductase qui vont participées à la réduction des dihydroflavonols en 2R, 3S, 4S leucoanthocyanidine. La formation des anthocyanidines se fait grâce à l'action des anthocyanidines synthase qui conduira par la suite à la synthèse des anthocyanines sous l'action des anthocyanidines glycosytransférase. Les proanthocyanidines sont obtenus par l'action de deux enzymes : anthocyanidines réductase et leucoanthocyanidine réductase pour obtenir les deux polymères des tannins condensés : - (-) Epi- flavan-3-ols et (+) - Flavan-3-ols (**Dixon et al., 2004**).

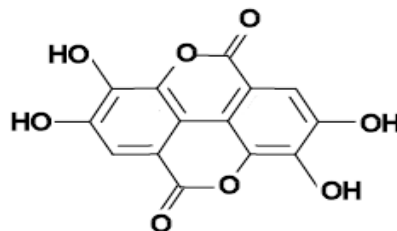


Figure 6: Structure chimique de l'acide ellagique (**Schofield et al., 2001**)

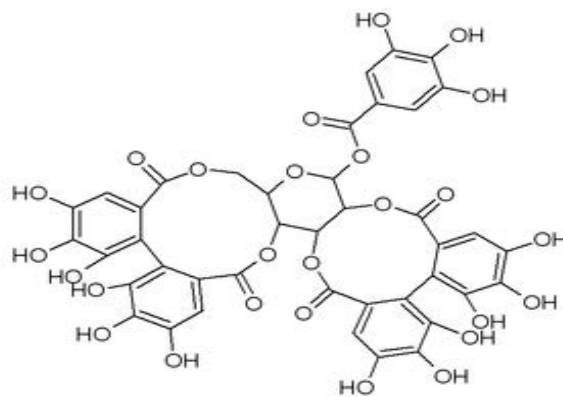


Figure 7: Structure chimique Ellagitannins (**Schofield et al., 2001**)



Chapitre III :
Les souches testées

I- *Staphylocoques aureus*

I-1- Généralités

Staphylocoques aureus occupe une place très importante dans la pathologie infectieuse humaine et animale ; en effet sa découverte dès l'aube de l'ère pasteurienne, le 3 mai 1880, Pasteur et Koch décèlent sa présence dans des pus de furoncle d'ostéomyélite. Un parasite microscopique en forme de gains sphériques associés plus fréquemment en amas ou en grappe de raisin et après une coloration de Gram, ces cocci regroupés en amas retiennent le violet et gentiane. Les *staphylococcus aureus* produisent une catalase et coagulase, ils sont aéro-anaérobies et poussent facilement sur un milieu ordinaire.

Elles sont répandues dans la nature, aussi bien dans l'air que dans le sol ou dans l'eau, elle est très souvent responsable d'infection pyogènes graves, depuis la peau jusqu'à la moelle osseuse (Avril, 2002).

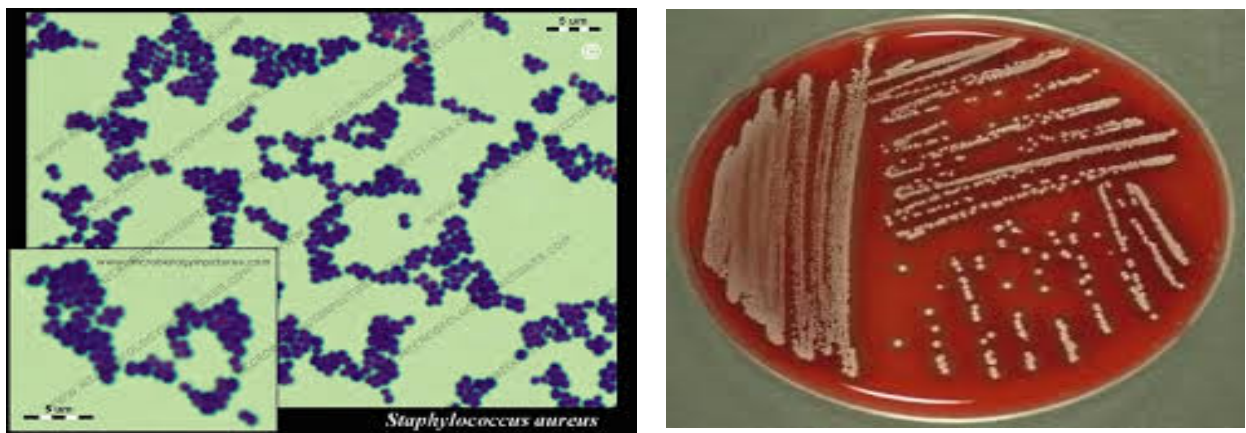


Figure 8 : Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* (Enelkirk ,2008).

I-2- Classification

Ordre : *micrococcales* (coques)

Famille : *Micrococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus* (**Bourgeois et al., 1996**).

I-3- Habitat

Staphylococcus aureus est une germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air, et l'eau (**Fauchère et Avril , 2002**). La bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'homme environ un tiers des sujet sont porteur sains, ils hébergent la bactérie au niveau des muqueuses (principalement de la fosse nasale antérieure, ainsi que sur la peau, la bouche, le pharynx et le périnée.) et les zones cutanées humides (périnée, aisselles) (**Nauciel et vildé, 2005**).

Staphylococcus aureus peut diffuser sous le mode épidémique (maternités, crèches, services de chirurgie et de réanimation), elle suivre aussi dans le milieu extérieur et est retrouvé dans l'environnement notamment hospitalier (base de transmission indirecte des souches a partir des vêtements, de la literie, du matériel médical, de l'air et des poussières) (**flandroids , 1997**).

I-4- Caractères morphologiques et culturels

Les *Staphylocoques* apparaissent à l'examen microscopique comme des cocci à Gram positif, bactéries sphériques de 0.8 à 1 mm de diamètre (figure 08), regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappes de raisin). Ils sont immobiles, sporulé habituellement sans capsules. Ces bactéries sont aéro-anaérobies, à métabolisme respiratoire et fermentaire, se cultivant facilement en 24 heures sur milieux ordinaires. *S. aureus* peut être aussi isolé sur milieux sélectifs (Chapman), les colonies sont connexes, lisses de 1 à 4 mm de diamètre (**Berche et al, 1989**).

I-5- Caractères biochimiques

De nombreuses souche de *S. aureus* produisent un pigment jeune doré ou citrin, non diffusible (caroténoïdes), et sont hémolytiques à la gélose du sang.

Toutes les espèces du genre *Staphylococcus* sont catalase positif. L'espèce *S. aureus* est capable de fermenter le mannitol, et le produire des enzymes extracellulaires (Staphylocoag ulase et DNA

ase), et il est possible de mettre en évidence la protéine A de la paroi, chez près de 90% des souches (**Berche et al, 1989**).

En résumé, le *Staphylococcus aureus* présente :

- Une catalase active.
- Absence d'Oxydase
- Existences de cytochromes D et E, de coagulase, d'une bétalactamase et d'une lipase.
- Présente d'une gélatinasse (**Holt J.G et al, 1994**).
- Elle a la capacité de réduire la tellurite de Potassium, d'hydrolyser l'hippurite de Sodium et de produit de l'Ammoniaque à partir de l'arginine (**Avril J.L et al., 1992**).

I-6 - Mode de transmission

La transmission directe de *Staphylococcus aureus* est possible de lésion ouvertes, telles que les infections cutanées ou muqueuse (Rhinopharyngites, Sinusites). Elle se fait directement par des gouttelettes, par la poussière, des squames cutanées et des objets.

Epidémiologique entre la source du contagé et le sujet infecté, donc l'air et ses poussières sont des vecteurs indiscutables de *S. aureus* qui se trouve sur les squames cutanées émises en permanence dans l'air.

A cet égard, de personnel hospitalier représente un vecteur important des Staphylocoques hospitalier (**Ferron, 1984**).

I-7- Pouvoir pathogène cutané

Staphylococcus aureus peut causer :

Des lésions suppurées : soit en :

- Formes cutanées : atteinte plus ou moins sévère des follicules pilo-sébacés (folliculite, furoncle, anthrax), atteinte péri-unguéal (onyxis, perionyxis, atteinte du sous-cutané panaris, phlegmons)
- Certaines formes superficielles (impétigo) peuvent se compliquer de lésions bulleuses graves lorsque la souche de staphylocoque est productrice d'exfoliatine.
- Elle est aussi responsable de mastites chez les femmes qui allaitent.
- Des atteintes pulmonaires peuvent s'observer notamment chez les nourrissons et chez les malades sous ventilation assistée (**Nauciel et vildé, 2005**).

II- *Escherichia coli*

II-1- Généralités

Escherichia coli appelé colibacilles, est bactérie intestinal des mammifères très commune chez les êtres humains. Découvertes en 1985 par *Théodore Escherichia*, dans les selles de nourrissons, certaines souches d'*Escherichia coli* peuvent être pathogènes.

C'est une bactérie normalement présente parmi la microflore digestive de l'homme et des animaux à sang chaud.

Cette bactérie était initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, mais d'acquisition de la résistance est fréquente, surtout en milieu hospitalier (**Nauciel et vildé, 2005**).

Cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études, constitue le modèle des bacilles à gramme négatif aérobie (**Bernard et Beynaud, 2003**).

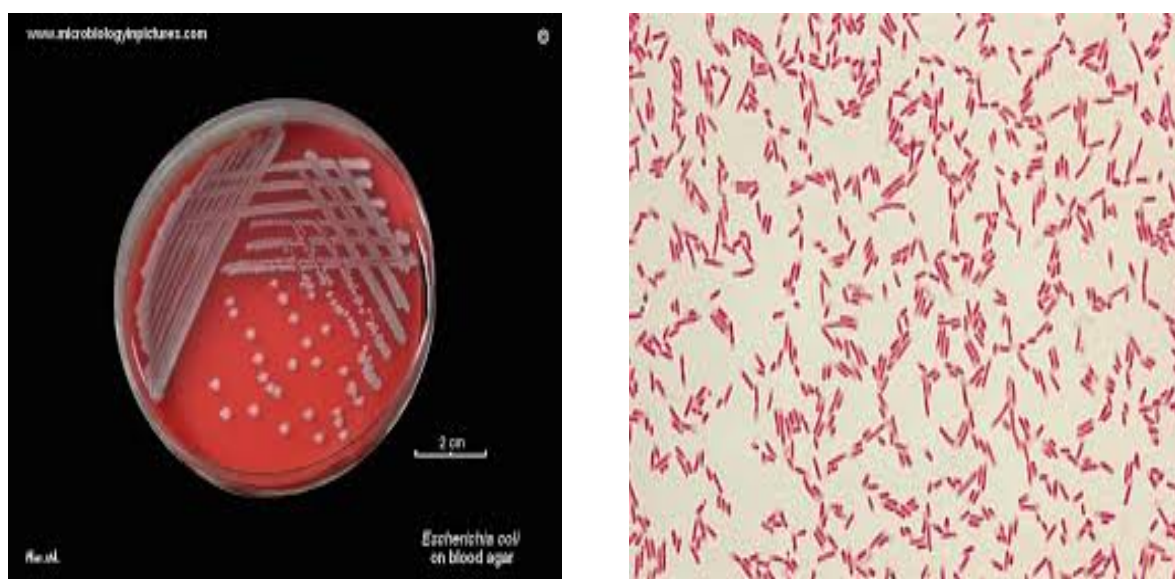


Figure 9 : Aspect des colonies d'*Escherichia coli* (Atif et Ronald, 2012).

II-2- Classification

- Règne :** *Bacteria*
- Embranchement :** *Proteobacteria*
- Classe :** *Gamma Proteobactéria*
- Ordre :** *Entérobactériales*
- Famille :** *Entérobactériaceae*
- Ganre :** *Escherichia*
- Espèce :** *Escherichia coli* (Pilet et al, 1987).

II-3- Habitat

E. coli est un hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux. Chez l'homme il est présent à raison de 10^9 bactéries/g de selle, de densité cependant très inférieur à celle des anaérobies qui constituent la flore dominante. La présence d'*E.coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale, on peut les retrouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et chez les animaux (Fauchère et Avril , 2002).

Chez l'homme, cette bactéries se retrouve surtout dans les infections génito-urinaires et aussi dans les syndromes digestifs (appendicites, lithiase, biliaires infectée), circulatoires à endocardites), de plus *E.coli* apparait comme un des agents des infections néonatales (Septicémie méningite) (Fauchère et Avril , 2002)

II-4- Caractéristiques morphologiques et culturales

Les coliformes sont des bâtonnets courts, gramme négatifs et peuvent former des chaines. Dans des conditions de culture défavorable par exemple en présence d'antibiotique), des formes longue et filamenteuses apparaissent. Dans les certaines variétés d'*E.coli* produisent de l'hémolyse sur la Gélose au sang. *E.coli* décomposent de nombreux hydrates de caractère avec production de gaz (Jawetz et Malnik et Adelberg, 1973).

II-5- Caractéristiques biochimiques

E. coli possède des caractères biochimiques particuliers permettant de le différencier des espèces voisines, parmi ces caractères :

- Production d'indole à partir du tryptophane.
- Absence d'utilisation du Citrate comme de Carbone.
- Absence de production d'Acétone (**Bernard et Beynaud, 2003**).

II-6- Mode de transmission

La présence d'*E-coli* dans les eaux et les aliments est le témoin d'une contamination fécal. La transmission à l'homme se fait par voie féco-orale. A partir du tractus intestinal, les bactéries atteignent facilement le vagin et l'urètre chez la femme et peuvent mener à des naissances par des souches maternelles d'*E-coli* provenant de la flore du périnée. Une contamination endogène peut être provoqué par des perforations intestinales ou survenir après chirurgie abdominales (**Goubau et Gompel, 2000**).

- Les principaux vecteurs de transmission d'*Escherichia coli* sont les suivants :
- Le matériel de traite mal nettoyé et mal désinfecté
- L'excrétion mammaire en cas d'infection à *Escherichia coli*
- L'emploi de l'eau contaminée
- La mauvaise réfrigération du lait

Le principal rempart contre la contamination du lait par *Escherichia coli* reste l'hygiène des aires de vie des animaux et d'hygiène de la traite, la surveillance des mammites et la qualité de l'eau (**Goubau et Gompel, 2000**).

II-7- Pouvoir pathogène

Les *E-coli* sont responsables de 60 à 80 % des infections des voies urinaires d'autant plus que l'urine est un milieu de culture qui permet la culture des *E-coli*, dont le moyen de protection habituelle contre les infections, anticorps, complètement ; phagocytose, ne peuvent jouer le rôle habituelle. Le plus souvent il s'agit de cystites se traduisent par une dysurie, une pollakiurie et une peu élevée (**Pilet et al, 1987**).

III- *Pseudomonas aeruginosa*

III-1-Généralité

Pseudomonas est le genre la plus important dans l'ordre des Pseudomonadales, ces bactéries sont des bâtonnâtes droits ou légèrement incurvés. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, très répandues dans a nature et caractérisées par leur résistance aux antibiotiques et antiseptiques.

Pseudomonas aeruginosa, isolé en 1882 par Gessard. C'est l'espèce la plus connu et la plus répandue du genre *Pseudomonas*. La plus pathogène (Prescott et al., 2010).



Figure 10 : Aspect des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* (Grosjean et al ,2009).

III-2-Classification

- Uni :** *Bactéries*
- Phylum :** *Proteobacteria*
- Classe :** *Gamma Proteobactéria*
- Ordre :** *Pseudomonadales*
- Famille :** *Pseudomonaceae*
- Ganre :** *Pseudomonas*
- Espèce :** *Pseudomonas aeruginosa* (SKerman et Seneath, 1980).

III-4- Habitat

Pseudomonas aeruginosa est un germe dans l'environnement : on le trouve dans les milieux humides. A l'hôpital, ce germe est répandu dans le même type d'environnement (robinet, éviers, douches, surfaces des thermomètres buccaux, nébuliseur, humidificateurs, siphons, etc.). Par ailleurs, cette bactérie peut vivre en commensale de l'homme au niveau du tube digestif (**flandroids**, 1997).

C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Elle résiste mal à la dessiccation. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux. Le bacille pyocyanique peut survivre et se multiplier dans une infinie variété de liquides et de milieux, de supports et de matériels, surtout s'ils sont humides (**Eyquem et al., 2000**).

III-5- Caractéristiques morphologiques et culturales

C'est une bactérie à Gram négatif : 1 à 3 µm de long, 0,5 à 1 µm de large. Parfois entourée d'une pseudo-capsule appelée slime, qui peut jouer un rôle important dans la pathogénéicité de cette bactérie.

Il peut être cultivé facilement sur tous les milieux aérobioses (température de 37°C ou 30°C), il dégage une odeur aromatique caractéristique de seringa due à la production d'ortho-amino-acétophénone, intermédiaire de métabolisme du tryptophane et non liée à la production de pigment.

Les colonies de *P.aeruginosa* sont particulières à cette espèce. Une dissociation spontanée en 03 types principaux observés :

- Colonies large, grandes avec une partie centrale bombée et contour irrégulier.
- Colonies petites, mates, légèrement bombé avec un bord circulaire régulier.
- Colonies bombées, opaques, visqueuses (**Eyquem et al., 2000**).

III-6- Caractéristiques biochimiques

Pseudomonas aeruginosa n'est pas capable de fermenter les sucres, mais peut les attaquer (Glucose en particulier).

D'autres caractères sont utiles pour le diagnostic de cette espèce :

- Indole (-), Urée (-), TDA (-) : Tryptophane désaminas
- H₂S (-), Gélatine (+)
- ONPG (-) : Orthonitrophinol-Galactose
- LDC (-) : Lysine-décarboxylase
- ODC (-) : Ornithine-décarboxylase
- Adh (+) : Arginine-dehydrogynase (**Eyquem et al., 2000**).

III-7- Mode de transmission

P. aeruginosa est un saprophyte aquatique largement répandu dans la nature. Chez 10% de la population saine. *P. aeruginosa* est principalement un pathogène hospitalier. La bactérie peut souvent pénétrer dans l'organisme par des blessures et des plaies.

Il a été établi que *P. aeruginosa* pouvait suivre dans les microgouttelettes et peut demeurer longtemps en suspension dans des aérosols, d'où le risque de transmission par voie aérienne (**Clifton et Packham, 2010**).

Une des principales voies de transmission est le contact avec de l'eau contaminée, mais comme la dose orale infectieuse est très élevée, les voies de transmission qui présentent les plus grands risques pour la santé sont l'exposition cutanée (par exemple dans l'eau aérosols inhalé qui ont été projetés par personnes infectées hors de leurs voies respiratoires).

La bactérie peut souvent pénétrer dans l'organisme par des blessures et des plaies. *P.aeruginosa* a une survie longue sur les surfaces humides de l'environnement hospitalier, sa transmission nosocomiale de patient à été montrée dans plusieurs études : le recours à des ventilateurs mécaniques contaminés dans les hôpitaux est également une source courante d'infections nosocomiales (**Banerjee et Stableforth, 2000**).

Il convient donc de respecter les règles d'hygiène dans le milieu hospitalier. Il est recommandé de séparer les patient colonisé des autres afin d'éviter au Maximum une transmission au sein de l'hôpital (**Douchain, 2001**).

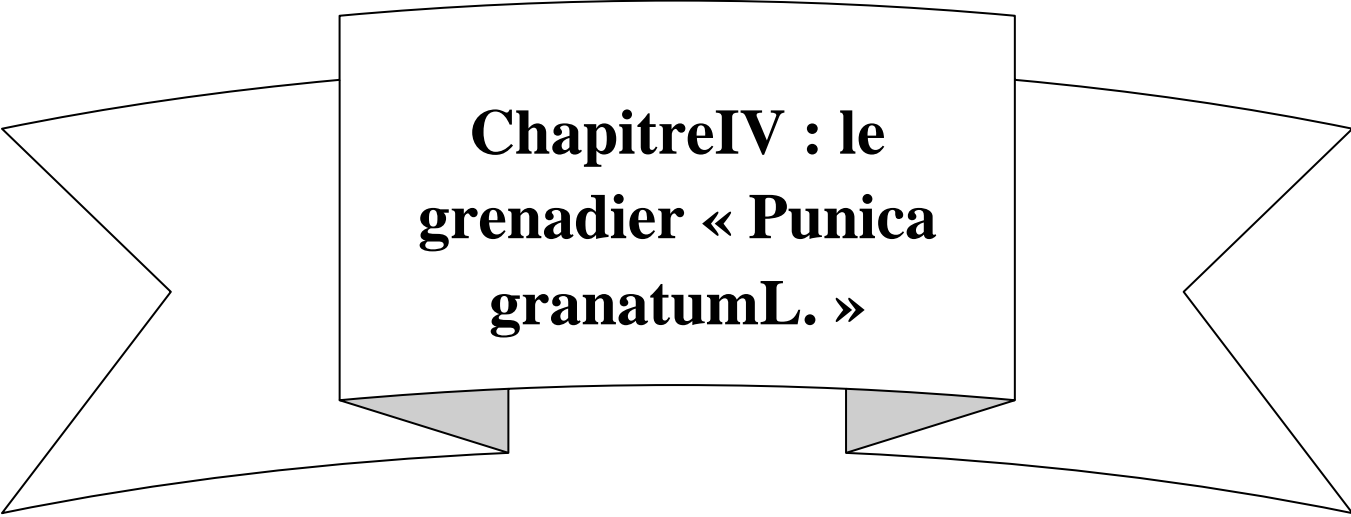
III-8- Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste, c'est un bacille commensal du tube digestif et de la peau. Il produit plusieurs toxines, il est à l'origine d'infections respiratoires chez les immunodéprimés et d'infections cutanées chez les grands brûlés avec formation de pus (**Mathieu et Fonteneau , 2008**).

Les infections de *P. aeruginosa* concernaient surtout les maladies recevant un traitement immunosuppresseur ou ayant une maladie grave sous-jacente, homéopathie ou cancer (**Fauchère et Avril , 2002**).

P. aeruginosa est certainement l'espèce la plus fréquemment rencontrée en pathologie infectieuse, elle est responsable d'infections cutanées, (Impétigo, Furoncles). Le plus souvent, elle se fixe par l'intermédiaire d'une colonisation sur la peau, superficiellement mais aussi sur une muqueuse.

Elle devient prédominante quand les organismes coliformes sont supprimés. On la retrouve aussi sur la peau humaine, *P. aeruginosa* n'est pathogène que lorsqu'elle s'introduit dans des zones dépourvues de défenses ou lorsqu'elle participe à des infections mixtes. Elle infeste des plaies. Produisant du pus bleu vert, cause la méningite lorsqu'elle est introduite par ponction lombaire (**Mathieu et Fonteneau , 2008**).



**ChapitreIV : le
grenadier « Punica
granatumL. »**

I-Introduction

Depuis des milliers d'années, le grenadier "*Punica granatum*", ses fruits, son écorce et ses fleurs, sont utilisés, au Moyen-Orient et en Asie, régions dont cet arbuste est originaire, pour leurs propriétés médicinales (**Gubernatis, 1882**).

D'abord disséminé par les nomades arabes, puis introduit en Chine au début du II^{ème} 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 (**Gubernatis, 1882**). Utilisé, de façon empirique, dans les médecines traditionnelles, pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires, le grenadier fait son apparition dans la pharmacopée française en 1818. Abandonné ensuite en raison de la toxicité de certains de ses principes actifs, le grenadier fait l'objet, depuis une dizaine d'années, d'un regain d'intérêt, tant sur un plan médical et pharmacologique que sur un plan cosmétologique. En effet, la grenade possède, par exemple, des propriétés anti-oxydantes supérieures à celles du vin rouge ou du thé vert (**Gubernatis, 1882**). Ainsi, après une brève présentation de l'historique, de la description botanique et de la composition chimique du grenadier et de ses différents organes, il sera ensuite rappelé les propriétés qui leurs étaient données dans la médecine traditionnelle. Enfin, il sera abordé, de façon détaillée et avec l'appui des nombreuses études réalisées sur le sujet, les nouvelles propriétés thérapeutiques que l'on attribue aujourd'hui à la grenade (**Gubernatis, 1882**).

II-Histoire de grenadier

Grenadier, *Punica granatum* L., riche d'une histoire, de plus de 4000 ans, la grenade, ce fruit majestueux, ne cesse de nous étonner. Très apprécié de la mythologie, des récits religieux ou de l'art, c'est aujourd'hui la science et plus particulièrement la médecine qui s'intéresse à ce fruit aux vertus étonnantes. Il sera, dans un première temps, rappelé l'histoire et la botanique de *Punica granatum* L. Dans un seconde temps, la composition chimique et les usages empiriques du grenadier seront envisagés. Enfin, il sera détaillé les principales propriétés thérapeutiques de cet arbre, découvertes ces dix dernières années.

La grenade est un symbole de fécondité et de richesse, un attribut de la royauté dans l'ancienne Egypte. Elle est considérée comme le fruit des dieux. Elle figure sur les bas-reliefs égyptiens, notamment sur ceux du temple de Karnak.

Les anciens Egyptiens préparaient un vin de grenade, le «shehan», obtenu en faisant fermenter les grains de grenade. De plus, les Egyptiens enterraient ce fruit avec les morts et le représentaient sur les murs des tombeaux.

En perse, la fleur du grenadier surmontait le sceptre royale.

Dans le temps de Salomon, les fleurs du grenadier ornaient les piliers ainsi que les parements brodés des vêtements sacerdotaux.

Le grenadier poussait dans les jardins suspendus de Babylone (**Benzi, 1999**).

III- La grenade dans les civilisations

III.1. Mythologie grecque

Dans la Grèce antique, la grenade était attribuée aux divinités des Enfers, Hadès et Perséphone. Hadès, le dieu des Enfers enleva Perséphone à sa mère Déméter et l'emmena aux Enfers. Zeus, le père des dieux, décida que la jeune fille pourrait retourner auprès de sa mère si elle n'avait rien mangé aux Enfers. Peu avant son départ, Hadès lui enfonça six arilles de grenade dans la bouche. Puisqu'elle avait bien mangé quelque chose aux Enfers, elle dut régner la moitié de l'année aux Enfers (automne et hiver) mais put rejoindre sa mère durant l'autre moitié (printemps et été) ; le Troyen Pâris mit fin à la dispute entre les déesses grecques Héra, Athéna et Aphrodite pour savoir qui était la plus belle en donnant une pomme (une grenade) à Aphrodite (**Martinez et al., 2012**).

III.2. Mention dans la Bible

Dans la Bible, la grenade passe pour un des 7 fruits importants qui étaient une bénédiction pour la Terre Promise d'Israël⁴². Selon la description dans Exode 28 au verset 33, les grenades étaient une partie de l'Ephod (= vêtement de cérémonie) du grand prêtre dont Dieu aurait ordonné la confection au peuple d'Israël. Les chapiteaux des 2 colonnes en minerais Jachin et Boas devant le temple de Salomon étaient décorés de deux rangées de grenades (1R 7, 18). Le premier roi d'Israël, Saul, habita un certain temps sous un grenadier (1S 14, 2). Dans le Cantique des Cantiques de Salomon, le mot grenade est utilisé plusieurs fois pour décrire la beauté féminine (Ct 4,3.13 ; 6,7). Pour finir, on trouve aussi le grenadier chez les prophètes Joël 1,12 et Hag 2,19 (**Martinez et al., 2012**).

III.3. Mention dans le Coran

Le fruit est mentionné dans le Coran aussi dans les sourates suivantes :

Les Bestiaux (sourate 6), 99 « Et c'est Lui qui, du ciel, a fait descendre l'eau. Puis 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 ses 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 foi» (**Benzi, 1999**).

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 font des excès. »

Le Miséricordieux (sourate 55), 68 : « Dans les deux, il y aura des fruits, des palmiers et des grenadiers » (**Benzi, 1999**).

III.4. Aire de répartition

L'aire de répartition de la grenade se situe en Asie occidentale et centrale ; les pays d'origine de l'arbre s'étendent de la Turquie via le Caucase (Arménie, Azerbaïdjan, Géorgie) et du Tadjikistan, Turkménistan et Ouzbékistan à l'est jusqu'en Iran, Afghanistan et Pakistan. Dans le bassin méditerranéen et au Proche Orient, par exemple en Iran, Arménie, Égypte, Espagne, Maroc, Algérie, Tunisie, Syrie, Liban, Israël et Anatolie, on cultive la grenade depuis des siècles. (**Martinez et al., 2012**). Actuellement, les principaux producteurs de grenade sont la Tunisie, la Turquie, le Maroc, l'Égypte, Israël, l'Iran, l'Inde et l'Afghanistan. L'Espagne, la Turquie et Israël sont les principaux pays exportateurs. On trouve également d'importants vergers en Californie, au Mexique, en Chine, au Japon, en Russie, au Pakistan, en Irak, en Birmanie et Arabie saoudite. Les fruits y sont presque exclusivement destinés au marché intérieur. En Inde, la grenade est aussi cultivée comme condiment (**Gubernatis, 1882**).

Quelques variétés de la grenade peuvent être transplantées dans des régions à hiver doux d'Europe centrale. Par exemple, un arbuste fleurit chaque année dans le jardin situé devant le musée des Arts Décoratifs de Budapest. (**Gubernatis, 1882**).

Avec la colonisation espagnole, la grenade s'est implantée dans les Caraïbes et en Amérique latine (**Gubernatis, 1882**).

IV- Grenadier dans le règne végétal

Le grenadier (*Punica granatum* L.), un gros buisson ou arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de bel aspect, appartient à la famille des Punicaceae, division Magnoliophyta, classe Magnoliopsida et à l'ordre des Myrtales. Il est originaire de l'Asie subtropicale et s'est acclimaté à la région méditerranéenne (**Sarkhosh et al., 2006**). Il est depuis longtemps cultivé à but

ornemental et pour ses fruits comestibles. Ses fruits contiennent de nombreuses graines, chacun enrobe dans une pulpe gélatineuse rouge cramoisi, le tout enveloppe dans une peau (écorce) coriace dont la couleur peut aller du jaune au rouge foncé. Les fruits sont consommés en frais et sont aussi utilisés pour produire un sirop dont le principal ingrédient est sa pulpe au goût acide. Depuis des milliers d'années, les propriétés astringentes de l'écorce du fruit et de l'arbre sont très prisées en médecine, particulièrement comme vermifuge. Actuellement, la grenade est cultivée dans la plupart des régions à climat chaud, car il a besoin de fortes chaleurs pendant toute la période de fructification (Melgarejo, 1993).

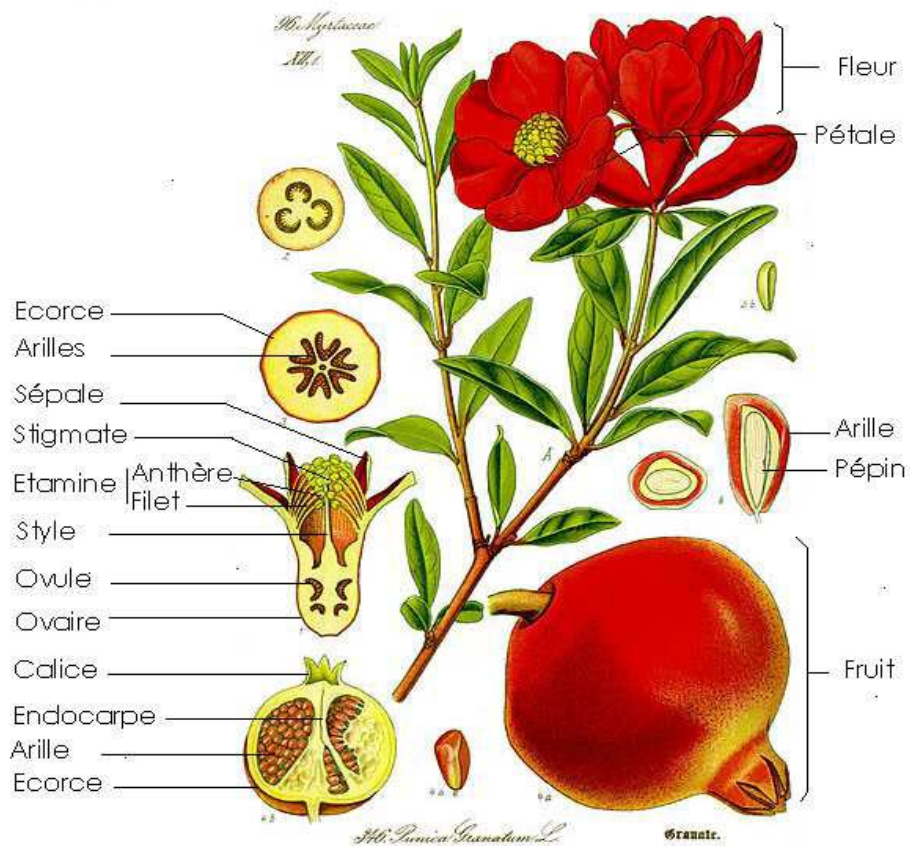


Figure 11 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum*) (Flora von Deutschland and Schweiz, 1885).

IV-1- Nomenclature du *Punica granatum*

- Nom scientifique : *Punica granatum*
- Nom français : grenadier
- Nom anglais : pomegranate
- Nom espagnol : Granada
- Nom italien : Melograno
- Nom arabe : Romane (Martinez et al., 2012).

IV-2- Classification du *Punica granatum*

- Règne : Plantae
 - Division : Magnoliophyta
 - Classe : Magnoliopsida
 - Ordre : Myrtales
 - Famille : Punicaceae
 - Genre : Punica
- Espère : *P. granatum* (**Garnier et al., 1961**).

V- Botanique**V-1- Biologie du grenadier****Description générale du grenadier**

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

a. Les feuilles

Les feuilles sont opposées. Elles peuvent avoir une disposition alterne sur les rejets ou être en touffes sur les pousses courtes. Elles sont glabres sur les deux faces. La face supérieure est vert foncé et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante (**Godet, 1991**). Ces feuilles entières, lancéolées, assez coriaces, et brillantes, présentent un limbe elliptique allongé, de 3 à 8 cm de long. Leur sommet peut être obtus ou allongé. Elles sont munies d'un court pétiole, de 1 à 5 mm de long, qui est généralement rougeâtre dessus (**Godet, 1991**). Elles ne possèdent pas de stipule (**Garnier, 1961**).



Figure 12 : Feuilles lancéolées et fruit de *Punica granatum* (Garnier, 1961).

b. Les fleurs

Les fleurs du grenadier portent également le nom de balaustes (Planchon et Collin, 1875). Elles sont très ornementales. Les fleurs rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un court pédoncule, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches, s'ouvrent de mai à juillet (Garnier et al., 1961). Les fleurs du grenadier sont actinomorphes et hermaphrodites (Courchet, 1897). Celles sèches sont sans odeur. Elles ont une saveur âpre et astringente et donnent à la salive une teinte violacée (Planchon et Collin, 1875).



Figure 13 : Les fleurs de la grenade (Garnier, 1961).

V-2- Graines

L'huile, obtenue à partir des graines de grenade, se compose à 80% d'acides gras insaturés, acides gras présentant au moins une double liaison, essentiellement représentée par l'acide punique, acide cis-9,trans-11,cis-15, octadécatriénoïque, mais également par les acides oléiques et linoléiques (**Planchon et Collin, 1875**). Cette huile se compose aussi d'acides gras saturés, qui ne présentent aucune double liaison, comme les acides palmitiques et stéariques (**Garnier, 1961**).

Il a été mis en évidence l'existence d'hormones stéroïdiennes dans les graines de grenade (**Tsuyuki et al., 1981**). De plus, ces graines contiennent de nombreux stérols, comme le cholestérol ou le stigmastérol. Enfin, elles renferment aussi un glycolipide entrant dans la composition des gaines de myéline des mammifères et le cérébroside (**Garnier, 1961**).



Figure 14 : présentation des grains de *Punica granatum* (**Garnier, 1961**).

V-3- Ecorces

L'écorce du fruit contient deux importants acides hydroxy benzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique. Elle renferme également des acides hydroxy-cinnamiques, des dérivés de flavones, des molécules de coloration jaune et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. De nombreux ellagitanins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la granatine A et la granatine B (**Lansky et al., 2007**). Ces tanins représentent jusqu'à 28% de l'épiderme du fruit (**Fournier, 1948**). La pelletiérine pourrait aussi se trouver dans l'écorce de la grenade. En effet, la méthode de dosage des alcaloïdes est basée sur l'utilisation du réactif Dragendorff. Cette méthode répond positivement à la présence de pelletiérine (**Lansky et al., 2007**).



Figure15 : L'écorce de *Punica granatum* (Lansky et al., 2007).

V-4- Valeur nutritionnelle

La grenade est une bonne source de fibres alimentaires et de folate et une très bonne source de vitamine C (Tab. 1) (Sumner et al., 2005).

Tableau 1: représente les différentes vitamines de la grenade (Sumner et al., 2005)

Grenade fraîche, pulpe et pépins (d'après anses ⁸ , valeur nutritive pour 100 g)			
<u>eau</u> : 81 g	<u>fibres</u> : 1 g	<u>valeur énergétique</u> : 74,2 kcal	<u>valeur énergétique</u> : 315 kJ
<u>protéines</u> : 0,95 g	<u>lipides</u> : 0,3 g	<u>glucides</u> : 16,2 g	<u>sucres simples</u> : 16,2 g
<u>Sels minéraux</u> et <u>oligo-éléments</u>			
<u>potassium</u> : 259 mg	<u>phosphore</u> : 8 mg	<u>calcium</u> : 3 mg	<u>magnésium</u> : 3 mg
<u>sodium</u> : 3 mg	<u>fer</u> : 300 µg	<u>zinc</u> : 120 µg	<u>civre</u> : 70 µg
<u>Vitamines</u>			
<u>vitamine C</u> : 11,4 mg	<u>vitamine B1</u> : 30 µg	<u>vitamine B2</u> : 30 µg	<u>vitamine B3</u> (ou PP) : 300 µg
<u>vitamine B5</u> : 590 µg	<u>vitamine B6</u> : 200 µg	<u>vitamine B9</u> (folate) : 6 µg	<u>vitamine B12</u> : 0 µg
<u>bêta-carotène</u> : 20 µg	<u>rétinol</u> : 0 µg	<u>vitamine E</u> : 0,55 mg	<u>vitamine D</u> : 0 µg

VI-Propriétés thérapeutiques des grenades (*Punica granatum* L.)

Le grenadier a été utilisé depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques. En médecine Ayurvédique, le grenadier est considéré comme « une pharmacie en soi » et il a été utilisé comme agent antiparasitaire, un « tonique sanguin » et pour traiter les aphtes, les diarrhées et les ulcères. Le grenadier a servi aussi de remède pour le diabète dans le système Unani de la médecine pratiquée au Moyen Orient et en Inde (**Melgarejo, 1993**). Les propriétés thérapeutiques potentielles du grenadier sont très variées et incluent traitement et prévention du cancer, les maladies cardiovasculaires, diabète, dysfonctionnement érectile et protection contre les radiations ultraviolettes. Ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydantes, anticarcinogéniques, anti-inflammatoires et antidiabétiques du grenadier (**Sarkhosh et al., 2006**).

VI.1. Propriétés antioxydantes

Parmi une quarantaine de fruits (dont les fraises, les framboises, les bleuets et le cassis), la grenade se retrouve en tête de liste quant à son contenu en antioxydants (**Halvorsen et al., 2002**).

Les principaux antioxydants retrouvés dans la grenade sont les flavonoïdes (particulièrement les **anthocyanines**), les **tannins** et l'**acide ellagique** (poly phénol antioxydant) (**Poyrazoglu et al., 2002 ; Tomas-Barberan et al., 2000**). Les anthocyanines donnent à la grenade sa couleur rouge. Les tannins confèrent un goût amer au jus de grenade et aux membranes blanches qui entourent les graines. L'activité des antioxydants de la grenade et de son jus serait **supérieure** à celle du thé vert et du vin rouge. Leur effet protecteur serait également plus puissant que celui d'autres boissons riches en composés phénoliques, comme le jus de bleuet et de raisin, ou le vin rouge (**Aviram et al., 2002 ; Ignarro et al., 2006**).

Selon une étude, la consommation de jus de grenade augmenterait l'activité antioxydante du sang, permettant ainsi de protéger les lipides sanguins (par exemple le cholestérol) contre l'oxydation (**Aviram et al., 2000, 2002**). Toutefois, les chercheurs ont constaté que les effets bénéfiques du jus de grenade pourraient aussi être attribuables à des sous-produits de la microflore intestinale (**Cerda et al., 2004**). Selon eux, il faut être prudent avant d'extrapoler ces résultats chez l'humain, puisque chaque individu présente un taux d'absorption et un métabolisme différents avec les antioxydants du jus de grenade (**Cerda et al., 2004**).

Plusieurs études rapportent que les fruits riches en flavonoïdes, en anthocyanines et en procyanidines, comme la grenade, auraient le potentiel de réduire les risques de maladies cardiovasculaires. Ces composés agiraient en synergie sur différents marqueurs, par exemple dans les plaquettes sanguines et les vaisseaux sanguins (**Chong et al., 2010**). Les antioxydants de la grenade pourraient également participer aux effets bénéfiques observés sur le cancer (**Adams et al., 2006**). Toutefois, il a été démontré que l'effet bénéfique du jus de grenade sur les cellules

cancéreuses serait supérieur à celui des antioxydants pris isolément. Malgré ces résultats prometteurs, d'autres études cliniques doivent être menées pour confirmer les effets de la grenade sur la prévention ou le traitement du cancer et des maladies cardiovasculaires chez l'humain (Adams et al., 2006).

VI-2-Activité anti-inflammatoire

Des études *in vivo* ont démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipooxygénase. La cyclo-oxygénase, enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (principaux médiateurs de l'inflammation), a été inhibée de 37% par l'extrait d'huile de graines pressées. La lipooxygénase, qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en leukotriènes, aussi médiateurs importants de l'inflammation, ont été inhibés de 75% par le même extrait (Planchon et Collin, 1875). Des rats obèses Zucker Fatty ayant reçu une supplémentation de jus de grenade ou d'extraits de fruits de grenadier durant 5 semaines montrent une diminution significative de l'expression des marqueurs de l'inflammation vasculaire, la trombospondine et la cytokine 28 TGF- β 1 et une augmentation significative de l'expression de la synthétase endothéliale de l'acide nitrique (e NOS) en comparaison avec les rats contrôles (Planchon et Collin, 1875). Cependant, les propriétés anti-inflammatoires du grenadier dans la protection de l'endothélium et dans la diminution de l'athérosclérose n'ont pas été encore validées par des essais cliniques chez l'homme (Adams et al., 2006).

VI-3- Activité antidiabétique

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l'absorption et augmente l'excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL cholestérol en améliorant les ratios total/HDL et LDL/HDL cholestérol. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques (Chong et al., 2010). sans affecter les paramètres diabétiques. Plusieurs études ont montré, en utilisant différents modèles animaux et mêmes des patients diabétiques, des effets bénéfiques du traitement avec les extraits de grenadier (Adams et al., 2006).

VI-4-Action anticancéreuse

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont démontré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développement de la tumeur (Piquemal, 2008). Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de

l'apoptose (Rivero, et al., 2001). Une étude clinique en phase II portant sur 46 hommes ayant le cancer de prostate récurrent a illustré que 35% des patients montraient une diminution significative du taux sérique de PSA (Prostate specific antigen) durant le traitement avec du jus de grenade. La même étude a indiqué que le grenadier pourrait affecter le cancer de prostate grâce à la combinaison de ses propriétés antiproliférative, apoptotique, antioxydant et anti-inflammatoire (Tanguy, J. 1971).

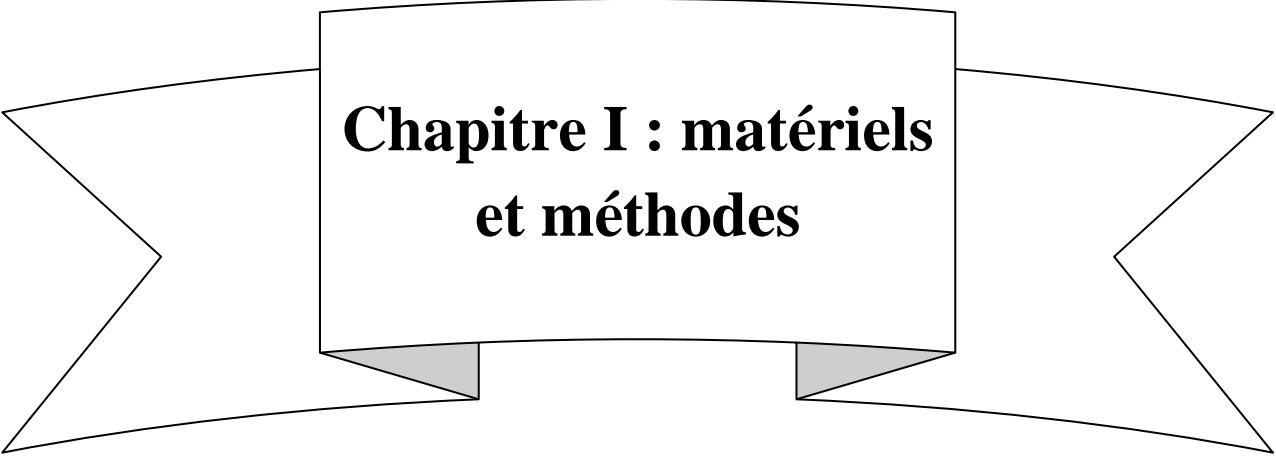
VI-5-Action antimicrobienne

Les polyphénols de grenade ont des effets antiviraux et antimicrobiens intéressants. Le jus de grenade contient des inhibiteurs d'entrée du HIV-1 qui peuvent être isolés par adsorption sur de l'amidon de maïs. L'étude de ce complexe montre qu'il bloque la liaison du virus avec certains récepteurs cellulaires (Xie et Dixon, 2005).

Prashanth et al. (2001) ont étudié, *in vitro*, l'action de différents extraits d'écorce de grenade (péricarpe) sur six espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*. Les extraits d'écorce de grenade employés sont obtenus à partir de solvants différents, permettant d'isoler les divers principes actifs de ce fruit. Ainsi, en utilisant comme solvant l'eau à température ambiante. Il y aura isolement des tanins et d'autres composés phénoliques, tandis qu'avec le méthanol, des tanins et des alcaloïdes sont extraits. Toutefois, le chloroforme permet d'extraire les alcaloïdes et enfin avec l'éther de pétrole, des stérols. Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Néanmoins, l'extrait méthanoïque semble posséder une activité antibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *S. aureus*, *P. vulgaris* et *B. subtilis*.



**Partie
expérimentale**



**Chapitre I : matériels
et méthodes**

I- Matériels et méthodes

I- 1- Problématique

Les maladies causées par les bactéries à travers le monde occupent la première place par leur fréquence, et sont vécues avec une acuité particulière qui justifie une réelle demande d'information.

L'incidence des maladies a augmenté durant ces dernières années, surtout chez les patients immunodéprimés. Elles affectent environ 20 à 40% de la population mondiale, principalement les enfants en âge scolaire.

La phytothérapie joue un rôle essentiel dans le domaine du traitement de ces maladies, car les plantes peuvent contribuer à les soigner. A cet effet, peut-on considérer le grenadier comme étant remède efficace dans le traitement de ces maladies.

I-2- Objectifs

L'objectif visé, dans le cadre de notre étude expérimentale, porte sur :

- La quantification des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes ;
- L'évaluation *in vitro* de l'effet antimicrobien de l'écorce du fruit de *Punica granatum* L. « Grenadier» sur quelques souches pathogènes d'origine bactérienne.

I- 3- Matériel végétal et site d'échantillonnage

Des fruits frais de la grenade ont été récoltés, d'une manière aléatoire, durant le mois d'Octobre 2015, à partir d'un champ de grenadier "*Punica granatum* L.", dans une zone localisée dans la commune de Hadjdj à 32km à l'Est de la ville de Mostaganem (Algérie).



Figure 16 : Vue générale d'un grenadier (Photo originale)

I-4- Méthodes

I-4-1- Préparation de la drogue végétale

Après récolte, les écorces des fruits ont été prélevées et mises à sécher à l'air libre et à l'abri de la lumière.

Les écorces séchées ont été, ensuite, broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique (Fig.17). Pour son utilisation ultérieure et afin d'empêcher son photo-oxydation, la drogue a été conservée à l'obscurité dans des bocaux sombres hermétiquement fermés. Les précautions prises visent à réduire les divers mécanismes de dégradation relatifs aux caractères organiques de ses matières premières (Ferrari, 2002), à savoir la dénaturation des métabolites secondaires tels que les huiles étherées (évaporation au delà de 40° C) (Kümkele et Lobmeyer, 2007).



Figure 17 : Pesée et préparation de la drogue végétale (**Photo originale**)

I-4-2- Préparation des extraits

Deux procédés d'extraction ont été adoptés. Se sont les méthodes traditionnelles d'extraction les plus couramment utilisées.

I-4-2-1- Méthode de Soxhlet

La méthode d'extraction employée est l'extraction soxhlet 10% (w/v). Cent grammes de drogue végétale broyée a été mise dans une cartouche d'extraction, en présence de 1000ml de méthanol pur. Après quatre cycles d'extraction, l'extrait obtenue a été soumis à une filtration sous vide à l'aide d'un filtre en microfibre de verre de Wattman $\neq 1$. Le filtrat, ensuite, a été récupéré dans un flacon opaque.

Après évaporation du solvant à l'aide d'un rotavapor de type Büchi à 40° C, un mélange aqueux a été récupéré après adition d'une quantité d'eau distillée. Enfin, la lyophilisation constitue la dernière étape de la préparation d'un extrait sec (Fig. 18). Celle-ci permet la meilleure conservation de la matière végétale. Le lyophilisat obtenu a été conservé dans des flacons sombres hermétiquement fermés.



Figure 18 : Matériel utilisé pour la méthode Soxhle (originale)

I-4-2-1- Méthode d'agitation

L'extraction de l'échantillon a été assistée d'un homogénéisateur Blender, selon le procédé de Kim et al. (2003). La matière sèche de l'écorce du fruit, finement broyée (100g), a été extraite avec 1000ml de méthanol aqueux (80%) pendant 20mn, à raison de 20000 tours/mn. Après filtration sous vide à l'aide d'un filtre en microfibre de verre de Wattman $\neq 1$, le résidu a été ensuite rincé avec 500ml de solvant aqueux et extrait à nouveau, dans les mêmes conditions, avec 1000ml de méthanol aqueux. Les filtrats obtenus ont été mis sous évaporateur rotatif afin d'éliminer le méthanol. Comme précédemment, l'extrait aqueux ainsi résultant a été également lyophilisé.



Figure 19 : Matériel utilisé pour la méthode d'agitation
(Photo originale)

I-5- Détermination des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Miliauskas et al. (2004). Un volume de 1ml de l'échantillon à doser (l'extrait méthanolique de l'écorce ou substance de référence) a été mélangé avec un volume de 5ml de Folin Ciocalteu (2M dilué 10 fois dans l'eau distillée) et un volume de 4ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à concentration de 75g/l. Après une incubation de 60mn à la température ambiante, l'absorbance du mélange a été lue avec un blanc fait à partir d'eau distillée à une longueur d'onde de 765nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6715 UV-Visible.

La teneur des composés phénoliques totaux, exprimée en équivalent acide gallique (GAE)/g de lyophilisat, a été déterminée en se basant sur une courbe d'étalon obtenue à partir d'une série de dilution, allant de 10 à 100 $\mu\text{g/ml}$.

I-6- Détermination des flavonoïdes totaux

La teneur des flavonoïdes totaux contenus dans les extraits étudiés a été déterminée en appliquant la méthode décrite par **Chang et al. (2002)**.

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, susceptible de donner avec le groupement CO un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ils forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fer et Aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**).

Un volume de 0,75ml d'AlCl₃ (2%) a été mélangé à un volume égal d'extrait. Les densités optiques ont été lues à 430nm après 10 minutes d'incubation à l'aide du spectrophotomètre, contre un courbe étalon préalablement tracée avec la quercétine comme substance de référence. Les expressions des résultats ont été obtenues à partir de l'équivalence du standard (quercétine) par gramme de lyophilisat (mg EQ/g).

I-7- Test anti-microbien

I-7-1- Préparation des dilutions des extraits

A partir des deux extraits, plusieurs solutions filles ont été préparées.

Dans un tube épendorff, une solution mère préalablement ajustée à raison de 0,1mg/ml dans le DMSO a subi des dilutions allant de 0,01 – 0,1mg/ml. (Tab.2).

Tableau 2 : Préparation des dilutions

Concentration %	Solution mère Extrait méthanoïque	DMSO	Solution mère Extrait méthanol aqueux	DMSO
10	0.1	0.9	0.1	0.9
20	0.2	0.8	0.2	0.8
30	0.3	0.7	0.3	0.7
40	0.4	0.6	0.4	0.6
50	0.5	0.5	0.5	0.5
60	0.6	0.4	0.6	0.4
70	0.7	0.3	0.7	0.3
80	0.8	0.2	0.8	0.2
90	0.9	0.1	0.9	0.1
100	1	0	1	0

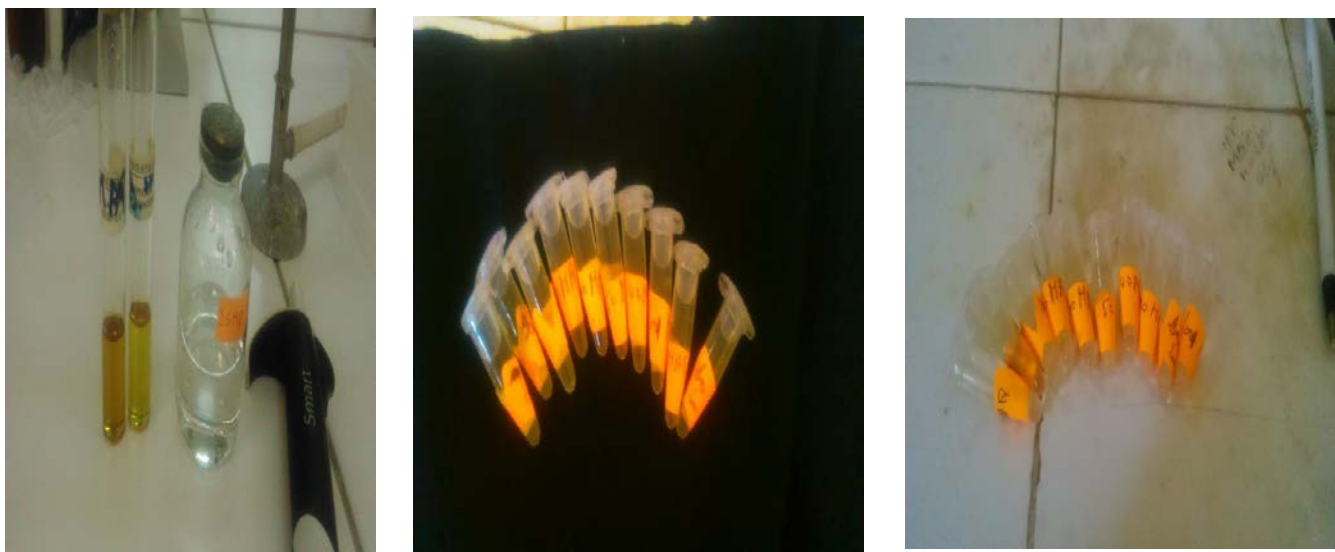


Figure20 : Préparation des dilutions (photo originale)

I-7-2- Les Souches bactériennes

Les microorganismes utilisés dans cette étude sont des germes pathogènes et ont été fournis par le laboratoire de microbiologie 1 et 3 de l'université Abdel Hamid Ben Badis Wilaya de Mostaganem, leur prélèvement et leur isolement se faisaient en respectant les normes d'hygiène et en utilisant les milieux de culture sélectifs adéquats.

Les germes sélectionnés pour cette étude sont :

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*

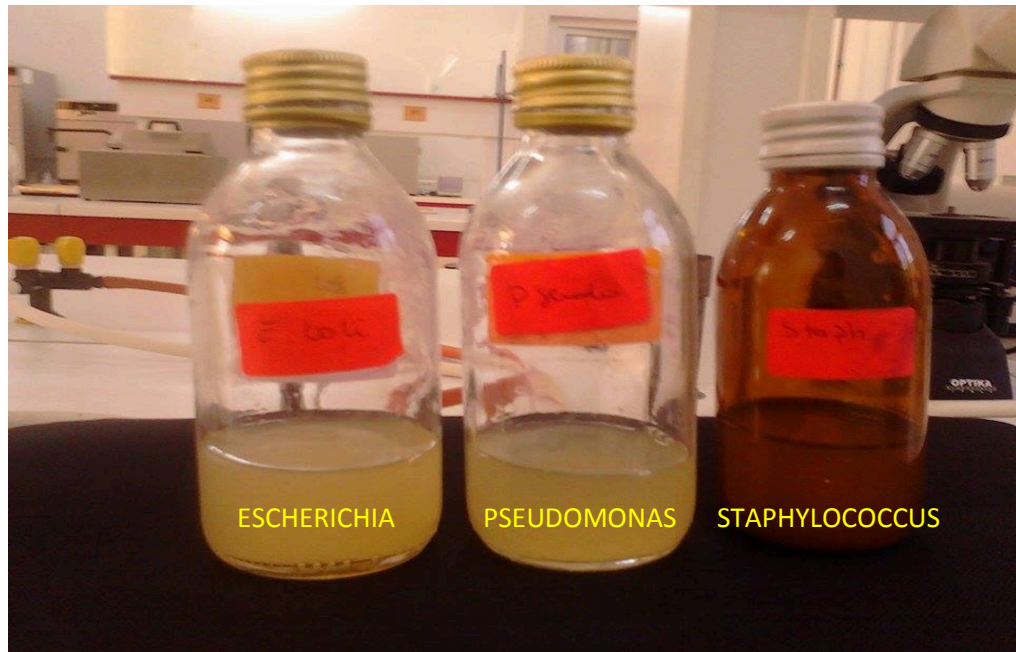


Figure 21 : Les trois souches bactériennes (photo originale)

I-8- Identification des souches bactériennes

L'identification des souches bactériennes citées est basée surtout sur l'étude de leurs caractères morphologiques et biochimiques

I-8- 1- Etude microbiologique

I-8-2- Examen macroscopique :

Cet examen se base sur l'observation des plusieurs caractéristiques principales qu'il faut les prendre en considération pour évaluer l'aspect macroscopiques, parmi ces caractéristique on cite :

- La croissance de colonie soit : glabre, poudreuse, duveteuse, pâteuse, soyeuse, laineuse, floconneuse, etc...
- La surface soit : Plante, en dôme, plissée.
- La présence des rayons fins ou larges, courts ou longs, s'enfonçant dans la gélose ...
- La couleur du recto et verso.
- La présence d'un pigment diffusible dans la gélose ou non.

I-8-3- Examen microscopique :

Cet examen est réalisé par une coloration de Gram qui permet de connaître le type de Gram de la bactérie (positif ou négatif) ainsi que leur morphologie (bâtonnet ou Cocci). Les bactéries qui apparaissent en violet sont dites bactéries à coloration de Gram positive et celles qui présentent une couleur rose sont appelées bactéries à coloration de Gram négative.

I-8-3-1- Coloration de Gram

- **Principe**

C'est la coloration de base en microbiologie, elle permet de déterminer le Gram des bactéries. Elle est réalisée à partir des colonies ou partir de l'urine.

- **Technique**

A l'aide d'une anse de platine on prend une goutte de la suspension bactérienne qu'on dépose au centre d'une lame propre et dégraissée celle-ci est étalée en cercle allant du centre. Le frottis doit être mince homogène. Le frottis est ensuite séché et fixé à la chaleur :

-Séchage du frottis au séchoir.

-Fixation par passage trois fois dans la flamme de bec bunsen.

Une fois le frottis préparé, on réalise une coloration (**François et al ; 2011**).

- **Coloration**

-Inonder le frottis de violet de gentiane pendant 1minute.

-Chasser le violet de gentiane avec le lugol, laisser agir pendant 30secondes.

-Rincer la lame avec l'eau.

-Décolorer en inondant le frottis d'alcool à 95°C pendant 5S.

-Recouvrir la lame de fuchine diluée pendant 10à20 S.

-Rincer avec un filet d'eau.

-Sécher et observer à l'immersion au G×100 (**François et al ; 2011**).

- **Lecture**

Coloration en violet → Gram positif

Coloration en rose → Gram négatif

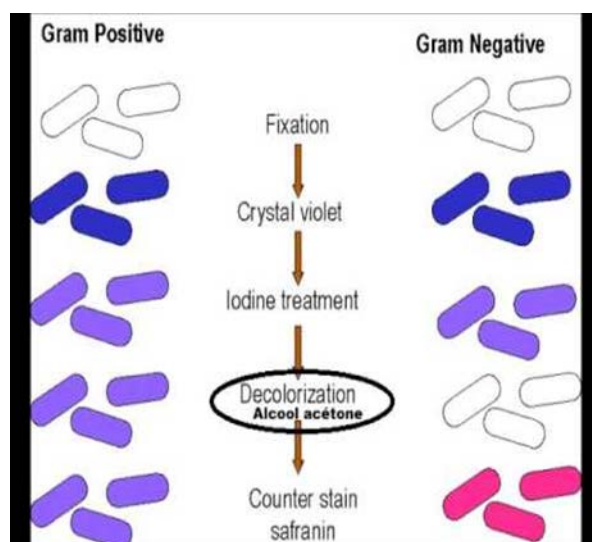


Figure 22: Coloration de Gram (Françoit et al ; 2011).

I-9- Etude de l'activité antibactérienne des différents extraits :

I-9- 1- Technique d'antibiogramme :

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

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Petri. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

- **Application des disques d'antibiotiques**

Les disques sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface de gélose Mueller Hinton (MH).

Une distance minimale de 15mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés au minimum de 30 mm de sorte que les zones d'inhibitions ne se chevauchent pas.

Les boîtesensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h. (Khouli, 2012).

- **Lecture**

Mesure le diamètre d'inhibition de chaque disque d'antibiotiques au moyen d'un pied à coulisse.

Comparer ces résultats aux valeurs critiques

- **Les antibiotique utilisé**

Tab 3 : les antibiotiques utilisés

Numéro	1	2	3	4
Nom	Gentamycine	Pénicilline G	Pénicilline P	Nitroxoline

I-9-2-Application sur les souches bactériennes

I-9-2-1- Préparation de disques d'antibiogramme

Les disques sont préparés à partir du papier Wattman n°3 à raison de 5 mm de diamètre, les disques ont subi une stérilisation à 120C° pendant 20 minutes en vue sont ensuite immergés durant 30 minutes respectivement dans chaque extrait expérimental préparé précédemment.

I-9-2-2- Préparation d'inoculum :

L'inoculum est préparé à partir des colonies jeunes. Un prélèvement d'une seule colonie est effectué à l'aide d'une anse à platine, puis mis dans 10 ml de bouillon nutritif puis porté à l'incubation pendant 03 heures à 37 C° pour voir une pré-culture, la densité optique lue à l'aide d'un spectrophotomètre de type JENWAY, 6715 UV/Vis à 625 nm est justifiée de 0.08 à 0.1 soit environ 108 UFC/ml

I-10- Étude de l'activité antimicrobienne des différents extraits

I-10- 1- Diffusion sur milieu gélosé par la méthode des disques :

L'étude qualitative détermine le degré de sensibilité des micro-organismes à la substance ajoutée au milieu. Différentes techniques sont utilisées pour étudier cet effet. La plus importante est la méthode des disques dont le principe se base sur la diffusion des substances testées du disque vers le milieu de culture solide.

Pour réaliser ce test on utilise le milieu Muller-Hinton agar pour la culture des différentes souches bactériennes examinées. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri avec épaisseur de 4 mm, puis les boîtes sont séchées à 37° pendant 30 min avant l'utilisation. (Lesure et al., 2007).

- **Technique**

Après l'étalement de chaque suspension bactérienne prélevée de l'inoculum sur Muller Hinton par la méthode d'écouvillonnage. Les disques de chaque dilution préparée sont placés stérilement sur la surface de la gélose à distances égales.

Chaque boîte de Pétri réalisée comprend disques sont imprégnés dans l'extrait à concentration différentes (**100mg/ml, 80mg/ml, 50mg/ml**) et une boîte témoin contient un disque vierge sert de disque control et de trouve imprégné d'eau distillée stérile.

Les boîtes ont été incubées à 37c° pendant 24h, l'activité antibactérienne a été traduite par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques, le diamètre obtenu est mesuré en mm, ça nous permis de déterminer le taux d'inhibition de l'extrait de *Pinuca granatum.L*

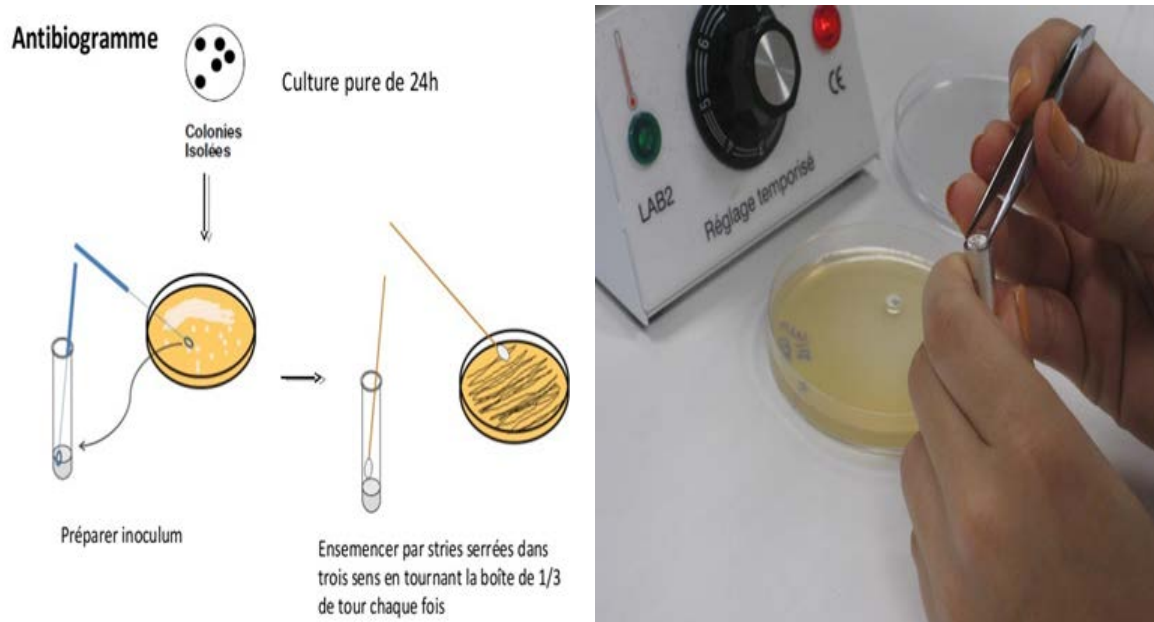


Figure 23 : Diffusion sur milieu gélosé par la méthode des disques (Françot et al ; 2011, originale).

I-10-2- Diffusion sur milieu gélosé par la méthode des puits ou cylindre

Proposé par Cooper et Woodman en 1946, reprise par Shroder et Messing (1949), elle mesure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. Elle consiste à découper un tronc circulaire vertical dans la gélose et d'y verser une solution d'HE de concentration connu. L'HE diffusant radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne ou fongique. (Bousbia, 2004).

- **Préparation des boîtes**

Couler la gélose dans les boîtes de Pétri après refroidissement, percer à l'emporte-pièces des trous régulièrement espacés.

- **Dépôts des extraits**

Dans le puits central déposer l'extrait dans la première boîte.

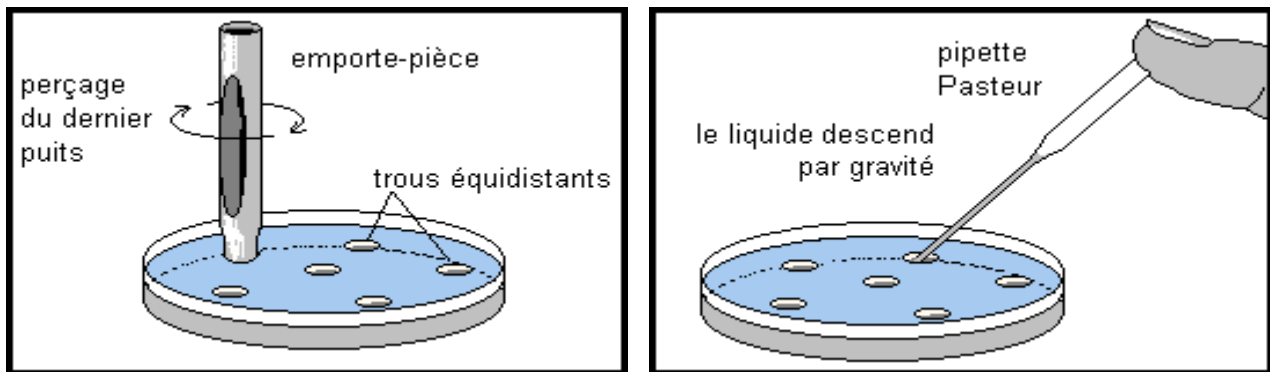


Figure 24 : Diffusion sur milieu gélosé par la méthode des puits ou cylindre (**Bousbia, 2004**).

Lors de ces dépôts, on veillera à ne faire ni débordement ni éclaboussures et à remplir suffisamment chaque puits. Il est conseillé de s'exercer avant à l'utilisation de la pipette Pasteur.

- **Marquage de la boîte**

Il faut marquer sur le couvercle le nom des dépôts et faire un trait de feutre entre boîte et couvercle au cas où celui-ci tournerait.

La boîte est placée à l'étuve pendant 24 heures au minimum et à température 37 C°

NB : la vitesse de migration des substances dans la gélose dépend de la température, de la concentration des substances utilisées.

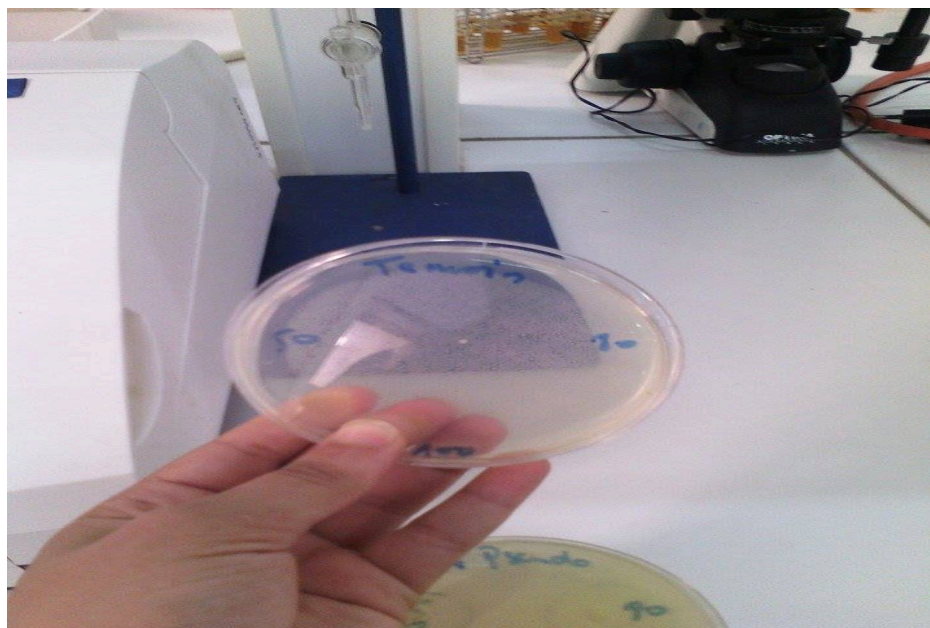


Figure 25 : Marquage de la boîte (photo originale)



Chapitre II :
Résultats et discussions

II. Résultats et discussion

Dans la présente investigation, deux orientations ont été étudiées. La première consiste à estimer la disponibilité en métabolites naturels dit de défense, dont laquelle les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes totaux ont été quantifiés. Alors que la seconde a permis d'évaluer le potentiel antibactérien *in vitro*, des deux extraits bruts issus de l'écorce des fruits de *Punicagranatum* L.

II.1. Rendement

Après extraction et récupération des extraits sous forme sèche, le rendement et la couleur de chacun d'entre eux des extraits a été déterminés et représentés dans (tableau 4).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif regroupant le rendement et la couleur des lyophilisats de l'écorce des fruits de *Punicagranatum* L.

Lyophilisats	Couleurs	Rendements %
Méthanol pur	Marron claire	23,38
Méthanol aqueux	Marron claire	10,93

Le rendement désigne la masse de l'extrait lyophilisé, il est exprimé en pourcentage par rapport à 100 grammes de Matière sèche. D'après les résultats représentés dans le tableau 4 et la figure 26, la méthode de soxhlet, en utilisant le méthanol pur semble être la plus performante, par rapport à l'agitation avec le méthanol aqueux. Les rendements sont de l'ordre de 23,38 et 10,93%, respectivement.

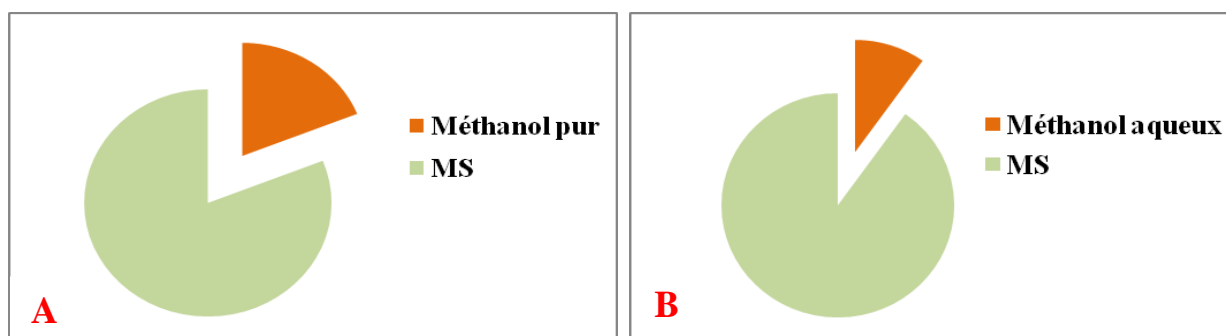


Figure 26 : Rendements en lyophilisats (A : Méthanol pur, B : Méthanol aqueux) d'écorce de Fruits de *Punica granatum* L.

II.2. Etude spectrophotométrique (Dosages)

Les résultats obtenus sur la teneur des composés phénoliques totaux ainsi que les flavonoïdes totaux sont représentés dans la figure 26 et le tableau 4.

II.2.1. Les composés phénoliques totaux

La méthode de dosage des polyphénols totaux, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrite en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origine plus diverses.

L'évaluation des composés phénoliques totaux, par la méthode de Folin-Ciocalteu, a été utilisée pour diverses raisons :

- ✓ Donner des résultats fiables et reproductibles ;
- ✓ Elle reste, néanmoins, une méthode analytique destructive (prise d'échantillon ; réalisation d'un extrait) qui bien qu'optimisée demande la mise en œuvre de nombreuses manipulations (Boizot et Charpentier, 2006) ;
- ✓ La grande longueur d'ondes d'absorption (765nm) du chromophore qui permet de minimiser les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent coloré ;
- ✓ La disponibilité de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- ✓ C'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (**Huang et al., 2005**).

Les données des absorbances optiques obtenues sur chacun des extraits ont été converties en doses à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage (Fig. 26). Celle-ci a été obtenue avec une série de dilution de l'acide gallique, allant de 1 – 10 mg/l. Une équation de régression linéaire, $y = 0,0588x$ et un coefficient de corrélation ($R^2 = 99,5\%$) ont été déterminés.

Les concentrations en composés phénoliques totaux ont été exprimées, en milligramme Equivalent Acide Gallique (EAG) par gramme de lyophilisat. Les données enregistrent des taux de l'ordre de 36,49 et 40,23 $\mu\text{g/ml}$, respectivement pour les lyophilisat préparés par le Méthanol aqueux et celui pur (Fig. 27).

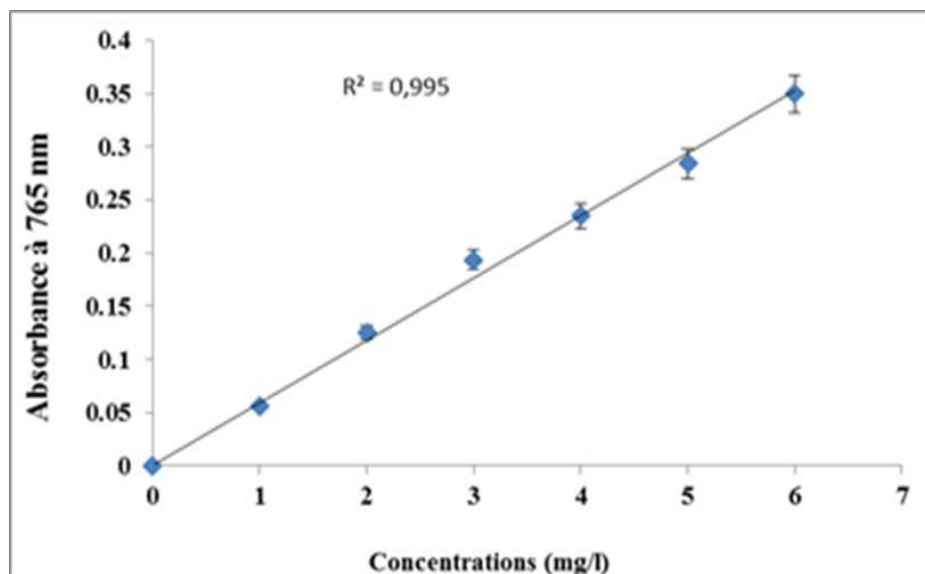


Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

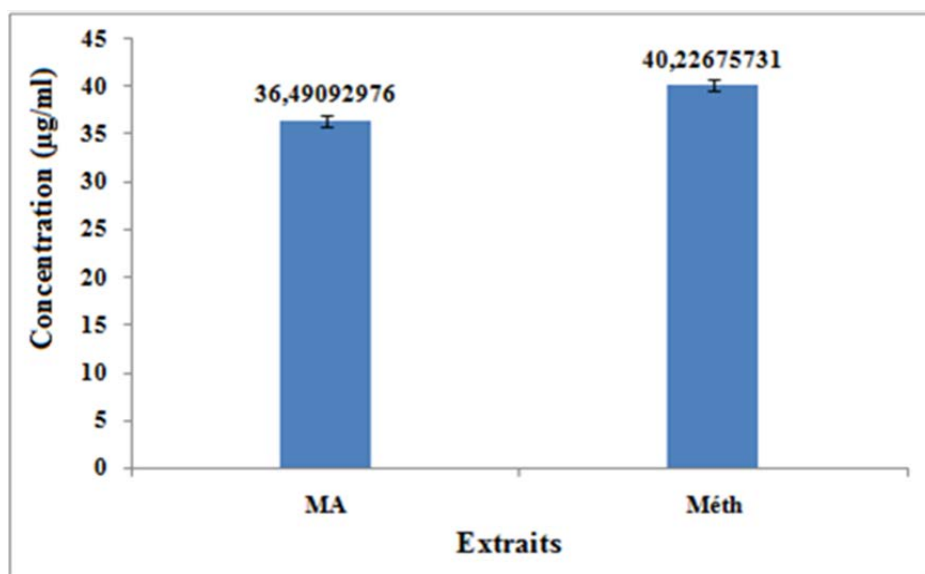


Figure 28 : Concentrations (mg/ml) des lyophilisats en composés

Les teneurs en composés phénoliques totaux, exprimés en milligramme Equivalent Acide Gallique (EAG) par gramme de matière sèche (Fig. 28), ont été également calculées en se basant sur les données des concentrations déterminées préalablement. Les composés phénoliques totaux dans l'écorce du fruit de *Punica granatum* quantifiés semble dépendre de la méthode d'extraction et du solvant utilisé. En effet, contrairement au Méthanol aqueux avec agitation, les composés

phénoliques totaux sont plus solubles dans le Méthanol pur par la méthode de soxhlet(402,26 Vs 364,90 mg EGA/g. MS).

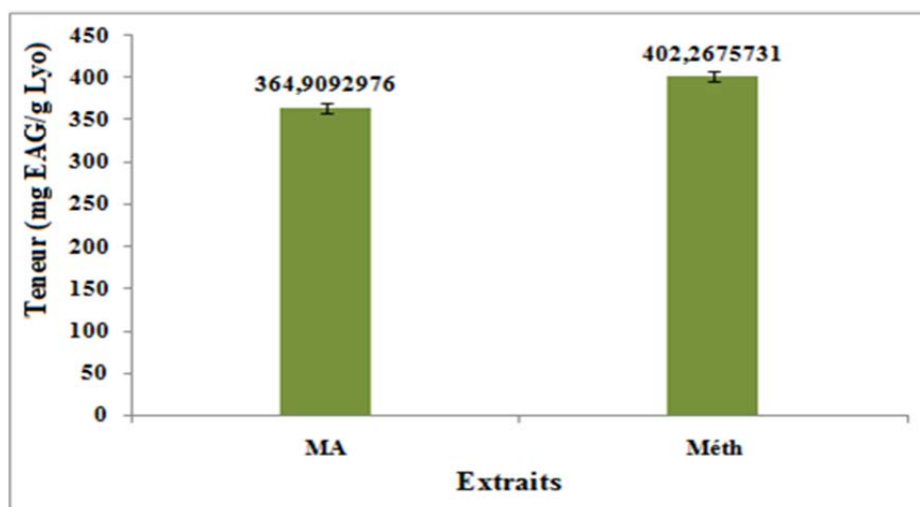


Figure 29 : Teneurs de la matière sèche en composés phénoliques totaux

II.2.2. Les flavonoïdes totaux

Comme précédemment, le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé par la méthode colorimétrique. La teneur en flavonoïdes totaux des deux extraits a été déterminé grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec une substance de référence ; la quercétine à différentes concentrations (0 – 1mg/L). Les résultats ont été, tout d'abord, exprimés en concentrations, puis transformés en mg équivalent quercétine par gramme d'extrait "lyophilisat" (mg EQu/g.Lyo). La courbe d'étalonnage a été ajustée avec un coefficient de corrélation $R^2 = 98,5\%$ et une formule de régression $y = 0,53x+0,018$ (Figure 30)

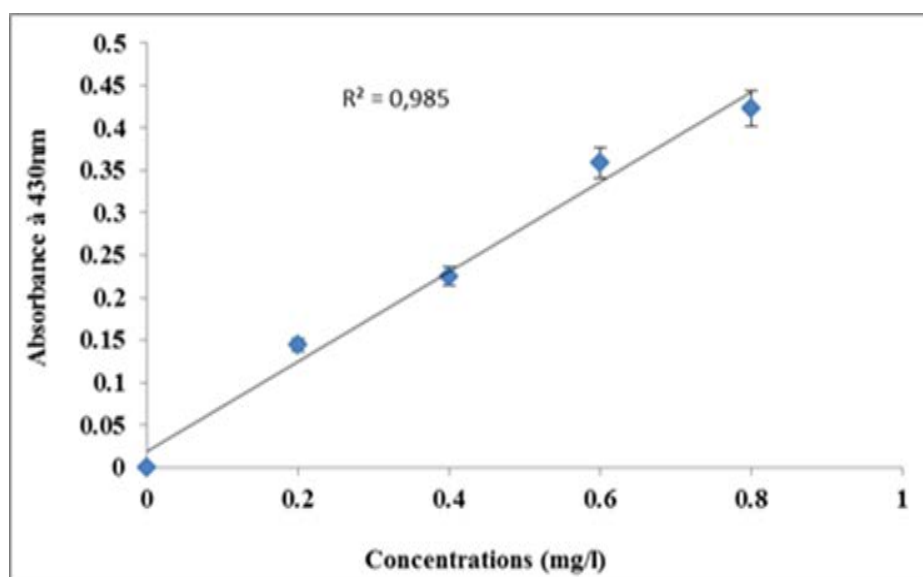


Figure 30 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

La quantification des flavonoïdes dans les extraits de *Punica granatum* a été estimée par la méthode utilisant le chlorure d'aluminium ($ALCL_3$). Comparativement à l'hydro-alcoolique, les résultats exprimés dans la figure x montrent une légère augmentation en faveur du lyophilisat issu par soxhlet avec le Méthanol pur. Les concentrations sont de l'ordre de 0,051 et 0,06 $\mu\text{g/ml}$, respectivement dans les lyophilisats méthanolique pur et aqueux.

Comme précédemment, les teneurs en flavonoïdes ont été également calculées (Fig. 30). Elles chiffrant à 1,258 (Méthanol aqueux) et 1,597 mg Equ/g. Lyo. (Méthanol pur). Ces données sont légèrement inférieures à celles déterminées par **Vasconcelos et al. (2000)** et **Beckman(2007)**.

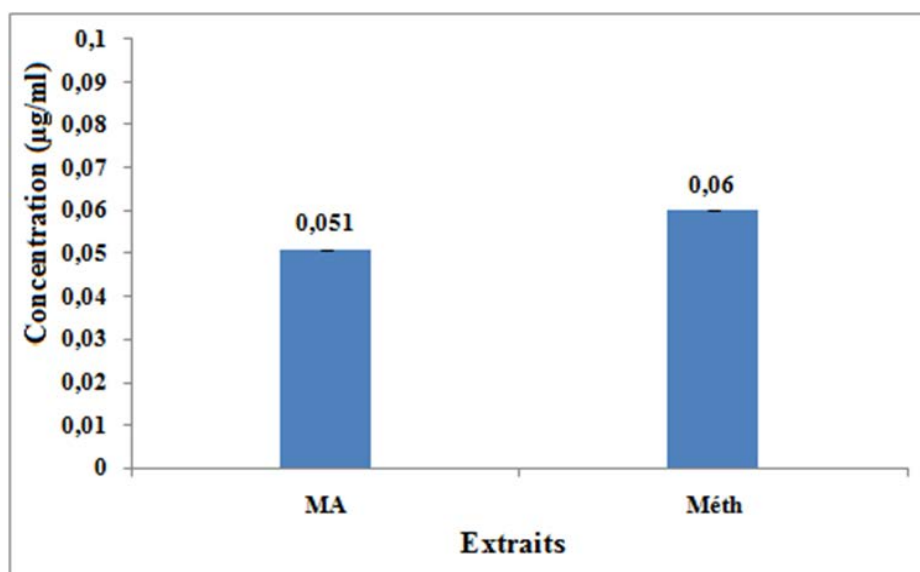


Figure 31 : Concentrations (mg/ml) des lyophilisats en flavonoïdes totaux.

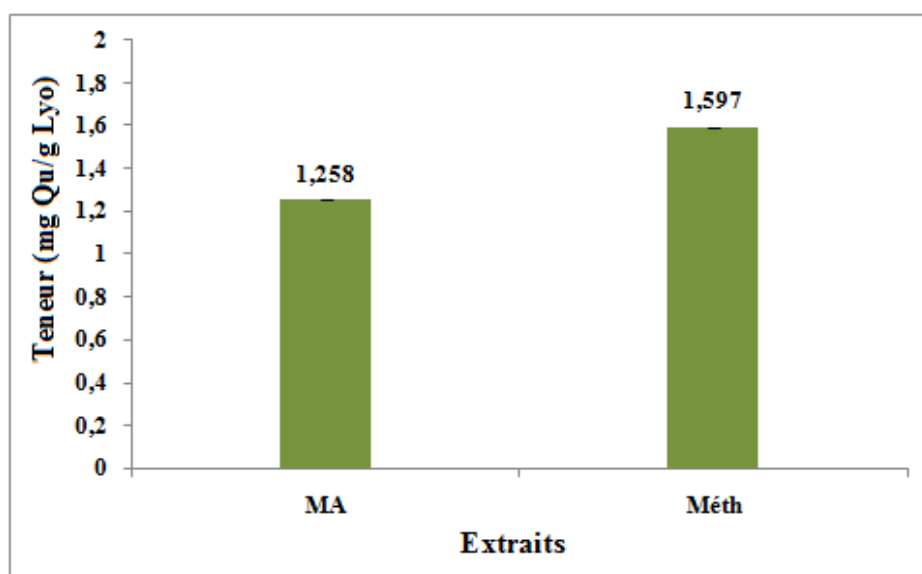


Figure 32 : Teneurs de la matière sèche en flavonoïdes totaux

De nombreux chercheurs confirment que les variations obtenues sur les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes totaux sont attribuées au procédé d'extraction (**Khoddami et al., 2013; Hasmida et al., 2014**), ainsi que le solvant utilisé (**Mohammedi and Atik, 2011 ; Jain et al., 2014 ; Sanda et al., 2015**). De même, d'autres justifient les variations dans les contenus de ces métabolites secondaires à la différence observée sur la polarité des solvants (**Caunii et al., 2012**).

II.3. Etude microbiologique *in vitro*

II.3.1. Identification physiologiques et biochimiques

Après une étude macroscopique et microscopique, les souches bactériennes utilisées ont été identifiées par une coloration de Gram

✚ ***Escherichia coli*** : bâtonnet à Gram négatif, non sporulés, parfois capsulés, immobiles ou mobiles. Les colonies sont de forme bâtonnet cylindrique avec des extrémités arrondies, de taille irrégulière, de couleur blanc-opaque

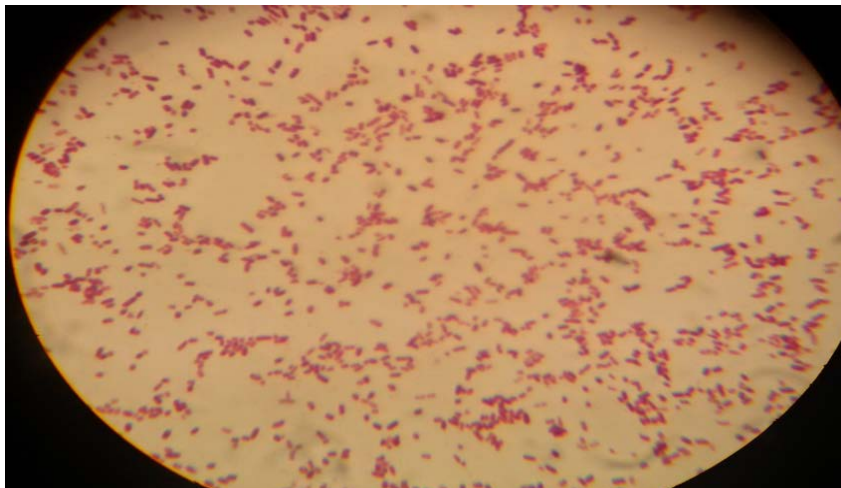


Figure 33 :Aspect microscopique d'E. coli G (x100)

Staphylococcus aureus : Cocci à Gram positifs, isolés ou groupés en diplocoques ou en amas ayant la forme de grappes ou de raisin, immobiles.

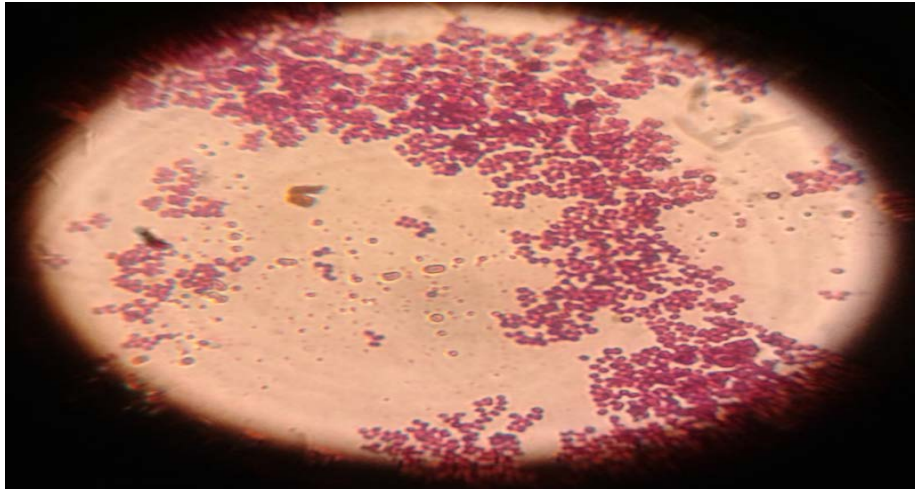


Figure 34 :Aspect microscopique de *Staphylococcus aureus* G(x100)

✚ *Pseudomonas aeruginosa*: Bacilles à Gram négatif, ne présentant pas de spores ni de capsules, elles produisent des pigments (jaune vert fluorescent) ce qui donne un aspect bleu vert aux colonies avec un reflet métallique. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles.

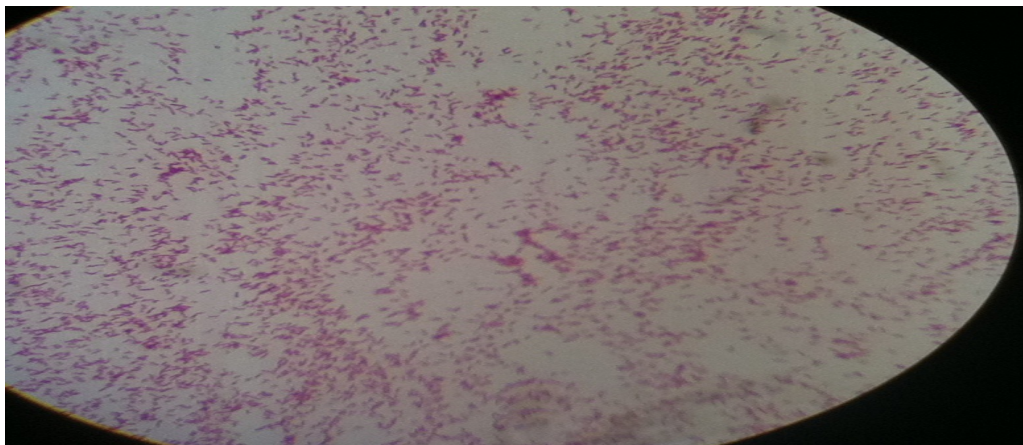


Figure 35: Aspect microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* G(x100)

II.3.2. Test d'antibiogramme

La technique consiste à ensemencer un germe pathogène sur le milieu Miller Hinton et l'amener au contact de la substance à tester par deux méthodes différentes : la méthode des disques et celle des puits. Les observations ont été enregistrées après 24 heures d'incubation à 37° C.

Parallèlement, d'autres tests ont été préconisés en utilisant des antibiotiques comme référence (Tab. 5 et 6). Il s'agit de " Nitroxoline", "pénicilline P", "pénicilline G" et "Streptomycine". Nitroxoline agit efficacement contre *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition d'un diamètre de 20 mm (Fig.36), 'pénicilline P, pénicilline G permettent d'avoir une zone de 15 mm de diamètre sur *Staphylococcus aureus*(Fig.37) et *Pseudomonas aeruginosa*(Fig.38). Cependant, cette dernière peut être inhibée par le quatrième antibiotique avec un diamètre de l'ordre de 17 mm.

L'action est décrite comme suit (Tab 6) :

- Diamètre d'inhibition nul..... (-)
- Diamètre d'inhibition entre 7 et 10 millimètres(+)
- Diamètre d'inhibition entre 10 et 16 millimètres..... (++)
- Diamètre d'inhibition supérieur à 16 millimètres (+++)

Tableau 5 : Les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents antibiotiques.

Antibiotique Souche Bactérienne	Pénicilline P	Pénicilline G	Streptomycine	Nitroxoline
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	0 mm	11mm	13 mm	20 mm
<i>Staphylococcus</i> <i>Aureus</i>	10 mm	15 mm	15 mm	11 mm
<i>Pseudomonas</i> <i>Aeruginosa</i>	12 mm	15 mm	17 mm	12 mm

Tableau 6 : L'action d'inhibition des différents antibiotiques.

Antibiotique Souche Bactérienne	Pénicilline P	Pénicilline G	Streptomycine	Nitroxoline
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	++	++	+++
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	++	++	++	++
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	++	++	+++	++

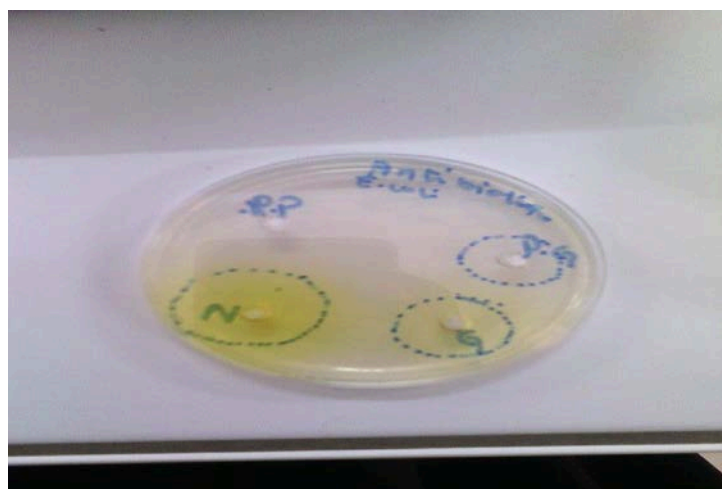


Figure 36: Sensibilité d'*Escherichiacoli* aux différents antibiotiques

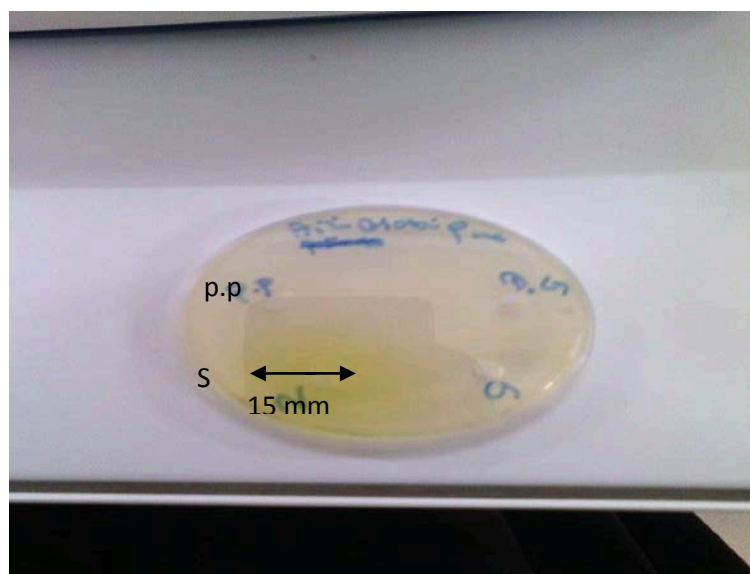


Figure37 : Sensibilitédestaphylococcus aureus aux différents antibiotiques

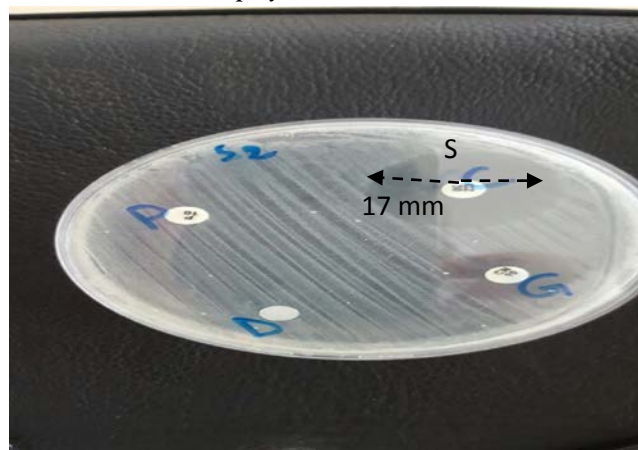


Figure 38 : Sensibilité de*Pseudomonas aeruginosa* aux différents antibiotiques

Les résultats du test d'antibiogramme (antibiotiques) représentés graphiquement sur les figures 33, 34 et 35, ont montrés une efficacité remarquable contre les souches bactériennes étudiées, avec des zones d'inhibitions variant entre 15 et 20 mm de diamètre,

II.3.3. Activité antibactérienne des extraits

Les résultats présentés dans les tableaux 7, 8 et 9 indiquent nettement une différence du pouvoir antibactérien et cela d'une souche à une autre et d'un extrait à l'autre.

D'une manière générale, l'inhibition de la croissance bactérienne dépendait de trois facteurs : La bactérie, la méthode utilisée et la concentration du produit testé.

Il est à signaler que les deux extraits n'ont pas montrés les mêmes effets. D'après les résultats obtenus, l'extrait d'écorce de *Pinuca granatum* à base de méthanol pur, et en comparaison avec l'hydro-alcoolique, a été le plus agissant sur la croissance bactérienne des trois souches bactériennes.

Que ce soit pour l'extrait méthanolique pur ou celui aqueux, les résultats ci-dessous montrent que l'activité inhibitrice des germes commence à partir d'une concentration de 50mg/ml. Un effet dose dépendance a été noté ; les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration de l'extrait appliquée.

L'analyse des données montrent une différence de sensibilité (Tab. 10,12 et Figure 36,38). En effet, la souche bactérienne *Escherichia coli* a présenté une sensibilité plus élevée, comparativement aux autres souches, enregistrant par conséquent des zones d'inhibition de 18 mm et 19 mm lorsqu'elle a été traitée avec l'extrait méthanolique à raison de 100 mg/ml. Dans les mêmes conditions, la souche *Staphylococcus aureus* a, également, montré une sensibilité vis-à-vis de l'extrait méthanolique, mais avec des zones d'inhibition légèrement inférieures à celles enregistrées précédemment (16,24 et 17,21 mm). Alors que *Pseudomonas aeruginosa* a enregistré que 15,22 et 17 mm de diamètre.

Comme cité précédemment, l'extrait hydro-alcoolique (Tab 11, 13 et figure 37, 39) a justifié un effet antibactérien, relativement, de moindre importance que l'extrait méthanoïque avec des zones d'inhibitions variant entre 14 et 17mm. De même, la souche *Escherichia colis* est montré également la plus sensible avec une un halo de diamètre de l'ordre de 16 et 16,22 mm. Cependant, les souches *Staphylococcus aureus* (15,14 et 15,25 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (15 et 14 mm) se sont montrées légèrement plus résistante.

La comparaison entre les zone d'inhibition des extraits méthanoïque et méthanol aqueux et les antibiotique Montre que les souches bactériennes a Gram positif ou négatif un rôle important dans nos résultats à cause de leur différence composition chimique de la paroi bactérienne, les Gram

négatif (*Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli*) a une réponse plus sensible que le Gram positif (*Staphylococcus aureus*). Nos résultats confirment que les diamètres d'inhibition des souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* est élevé que la souche *Staphylococcus aureus* pour les extraits méthanoïque et méthanol aqueux.

Les données obtenues sur les trois bactéries son similaires à celles menées par (Vasconcelos et al.,2006) et (Beckman ,2007), ou l'extrait de grenade a montré une inhibition significatives .

Melendez , et Capriles , 2006 ont également signalé que les extraits de fruits de la grenade possèdent une activité antibactérienne in vitro contre de nombreuses bactéries testées, y compris nous souches bactériennes , ce qui confirme nos résultats .

Tableau 7 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents extraits (50 mg/ml)

Souches	Extraits	Méthode de puits	Méthode de disques
<i>Escherichia coli</i>	Méthanol pur	15.41	13.2
	Méthanol aqueux	13.3	12
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Méthanol pur	14	13
	Méthanol aqueux	12.66	11.12
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Méthanol pur	14.34	12.1
	Méthanol aqueux	11.08	10.82

Tableau 8 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents extraits (80mg/ml)

Souches	Extrait	Méthode de puits	Méthode de disques
<i>Escherichia coli</i>	Méthanol pur	17	15
	Méthanol aqueux	16	15.44
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Méthanol pur	16.2	14.42
	Méthanol aqueux	13	15
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Méthanol pur	15	13
	Méthanol aqueux	11.72	13.32

Tableau 9: les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents extraits (100 mg/ml)

Souches	Extraits	Méthode de puits	Méthode de disques
<i>Escherichia coli</i>	Méthanol pur	18	19
	Méthanol aqueux	16.22	16
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Méthanol pur	16.21	16.24
	Méthanol aqueux	15.14	15.25
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Méthanol pur	17	15.12
	Méthanol aqueux	15	14

II.3.4.1.Méthode de puits

II.3.4.1.a.Extrait méthanolpur

Tableau 10 : Influence de l'extrait méthanol pur de différentes concentrations de l'écorce de *Punica granatum .L*(méthode de puit)

Concentrations de l'extrait Souches	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	15,41	17	18
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	14	16,2	16,21
<i>Staphylococcus Aureus</i>	14,34	15	17

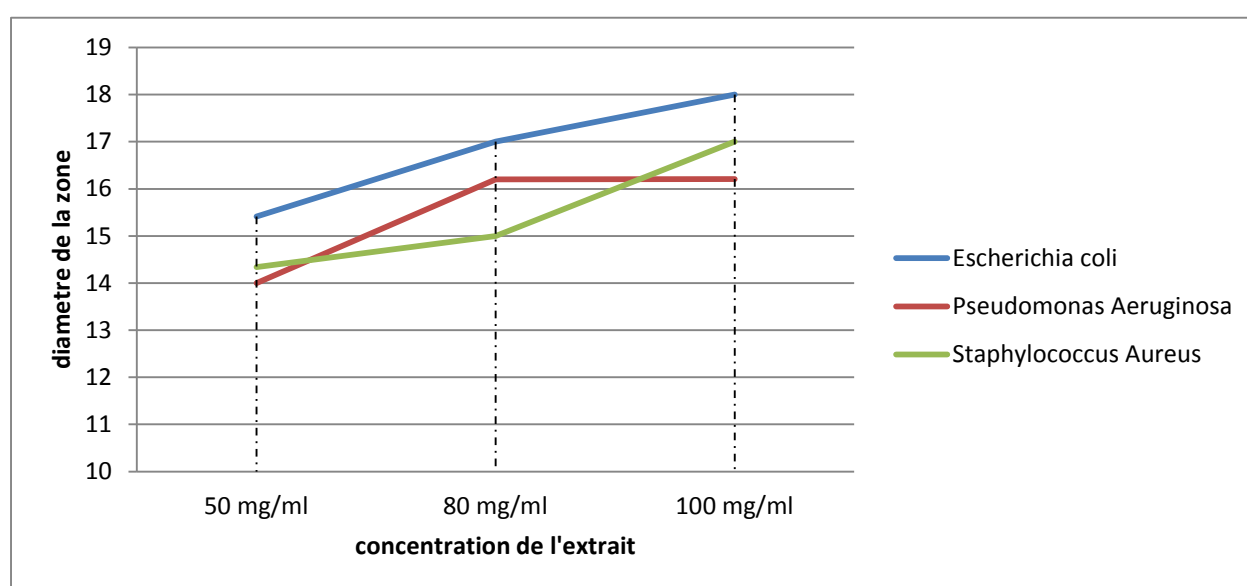


Figure 39 :l'effet antibactérien des différentes concentrations de l'extrait méthanol pur de l'écorce de *Punica granatum L.* (méthode de puit)

II.3.3.1.b.Extrait Méthanol aqueux

Tableau11 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents concentrations de l'extraits méthanol aqueux de l'écorce de *Punica granatum .L* (méthode de puit)

Concentration de l'extrait Souches	50 mg/ml	80 mg/ml	100mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	13,3	16	16,22
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	12,66	13	15,14
<i>Staphylococcus Aureus</i>	11,08	11,72	15

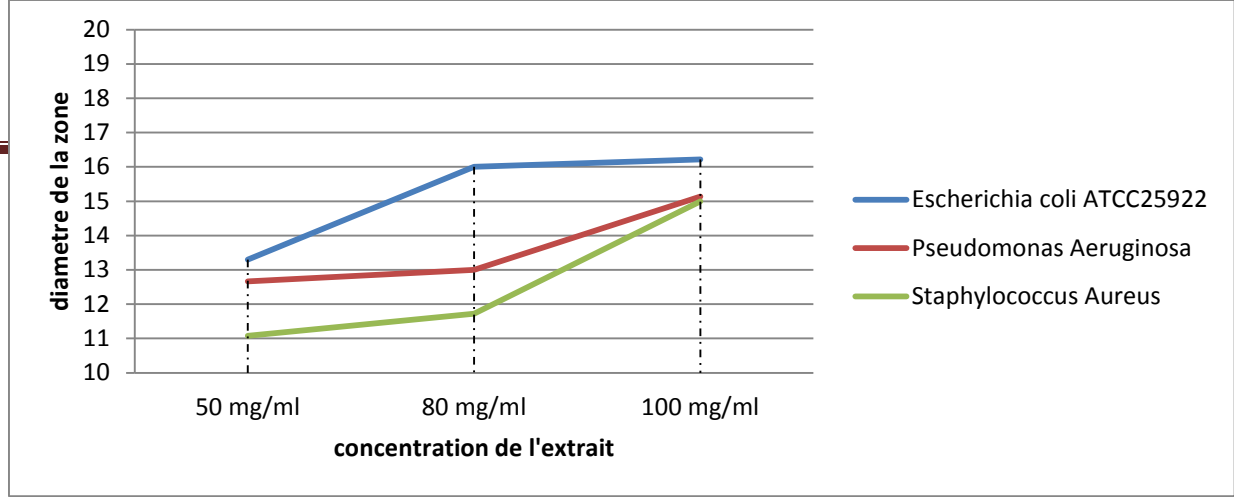


Figure 40 :l'effet antibactérien des différentes concentrations de l'extrait méthanol aqueux de l'écorce de *Punica granatum L.* (méthode de puit)

II.3.3.2.Méthode de disque

II.3.4.1.a.Extrait méthanol

Tableau 12 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différents concentrations de l'extraits méthanol pur de l'écorce de *Punica granatum.L* (méthode de disque)

Concentration de l'extrait Souches	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	13,2 mm	15 mm	19 mm
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	13 mm	14,42 mm	16,24 mm
<i>Staphylococcus Aureus</i>	12,1 mm	13 mm	15,12 mm

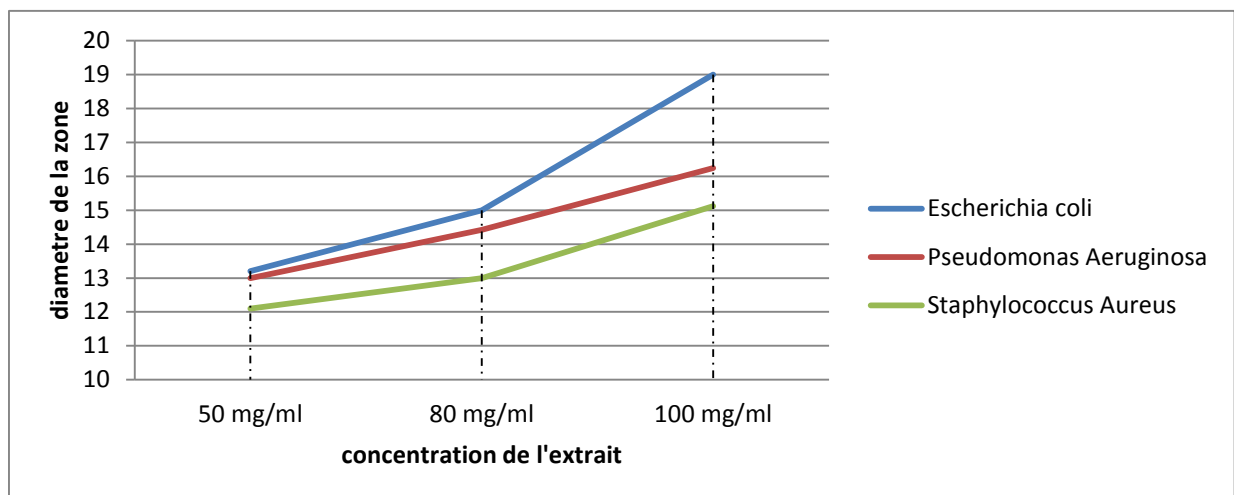


Figure 41 :l'effet antibactérien des différentes concentrations de l'extrait méthanol pur de l'écorce de *Punica granatum L.* (méthode de disque)

II.3.3.1.b.Extrait Méthanol aqueux

Tableau 13 : les diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait méthanol aqueux de *Punica granatum* L. (méthode de disque)

Concentration de l'extrait Souches	50 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	12	15,44	16
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	11,12	15	15,25
<i>Staphylococcus Aureus</i>	10,82	13,32	14

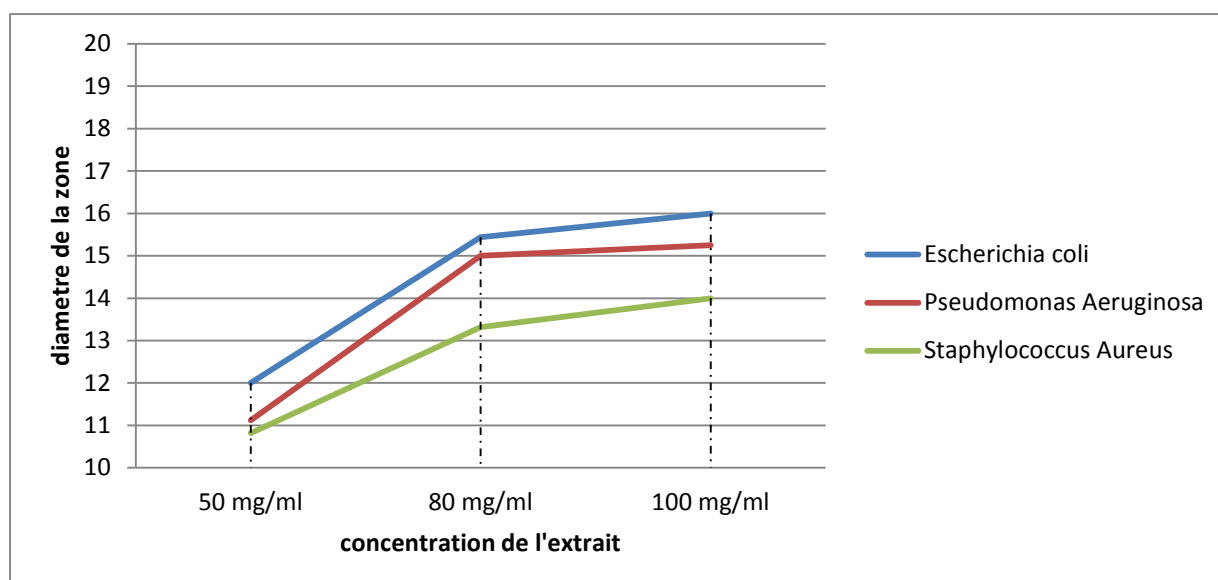


Figure 42 : l'effet antibactérien des différentes concentrations de l'extrait méthanol aqueux de l'écorce de *Punica granatum* L. (méthode de disque)

----Références bibliographiques----

A

Aoki, T., Akashi, T. and Ayabe, S. 2000. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J. Plant Res*, 113: 475–488.

Avril Jean-Loupe, (2002) Bactériologie générale et médicale, Ellipses, 2^{ème} édition.

Atif Ali Ahmed et Ronald.M Prezygodzki. 2012.Pathology exam Review , 133 : 228.

Adams LS, Seeram NP, et al. Pomegranate juice . 2006. Total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells.. *J Agric Food Chem* , . 54(3):980-5.

B

Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales (3ème éd.), Tec & Doc Lavoisier, Paris, 323 : 45-60

Bruneton, J. 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Ed. TEC & DOC, Paris , 550 :445-453.

Boudet, A.M. 2000. L'usine chimique. 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs. France, 123 :1 - 16.

Berche.P. 2003. Bactériologie générale, PCEM 2, Faculté de médecine Necker-Enfants malades, France, 567 : 89.

Bernarde Joly, Raynaud Alain Elie. 2003. Entérobactéries : systématique et méthode de diagnostic, Lavoisuer, 234 : 136-137.

Banerjee.D, Stableforth.D. (2000). The treatment of respiratory *pseudomonas* infection in cystic fibrosis : what drug and wich way ? *Drug.*, 1456 : 1053.

Benzi F.1999. L'histoire des plantes en Méditerranée : art et botanique. Editions Actes Sud, 175 :80-81.

C

Cook, N.C. and Samman, S. (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 178: 66-76.

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

Cerda B, Espin JC, et al. 2004. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr.*, 43(4): 205-20.

Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA 2010. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr*, 104 (Suppl 3):S28-S39.

D

Dixon, R.A. and Paiva, N.L. 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 2801-2808.

Dixon, R.A., Xie, D.Y and Sharma, S.B. 2004. Protocyanidins- a final frontier in flavonoid research ?. *New phytologis.*, 165: 9-28.

E

Enelkrik Paul. G. 2008.laboratory diagnosis of infection diseases, édition the point , 345 : 218

Eyquem.A, Alouf.J, Montanier. (2000). Traité de Microbiologie clinique, Piccin, P : 25.

F

Fritch, H. and Griesbach, H. 1975. Biosynthesis of cyaniding in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochem*, 14: 2437 - 42.

Fawe, A. 1997. Etude du mode d'action du silicium dans l'accroissement du concombre blanc poudreux: Intervention de composés à activité antifongiques et identification. Thèse de doctorat. II.1.1-II.1.9. Université Laval. Québec (Canada).

Fauchère J.L ; Avril J.L.2002. Bactériologie générale et médicale, Masson, 4^{ème} édition, 234 :123.

Ferron.A. 1984 bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine, par les professeurs de bactériologie médicale, 145 : 124.

Flora von Deutschland, O.W.T., Schweiz, O.U.D. 1885. Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera. Germany, 456 :45-78

G

Gee, J.M. and Johnson, I.T. 2001. Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*, 8 : 1-182

Gorinstein, S., Belloso, O.M., Parck, Y.S., Haruenkit, R., Lojeck, A., Ciz, M., Capsi, A., Libman, I.S. and Rakhtenberg, T. 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74: 309-315.

Gorinstein, S., Cvikrovà, M., Machachova, I., Haruenkit, R., Park, Y. S., Jung, S.T., Yamamoto, K., Ayala, A.L.M., Katrich, E. and Trakhtenberg, S. 2004b. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweets and white grapefruits. *Food Chemistry*, 84: 503- 510.

Gorinstein, S., Zachwie ja, Z., Katrich, E., Pawe lzik, E., Haruenkit, R., Trakhtenberg, S. and Belloso, O.M. 2004a. Comparison of the contents of the main antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid. *Lebensm-Wiss. U.- Technol*, 37: 337-343.

Gitz, D.C., Liu, L. and McClure, J.W. 1998. Phenolic metabolism, growth and UV-B tolerance in phenylalanine ammonia- lyase inhibited red cabbage seedlings. *Phytochemistry*, 49: 377-386.

Grundhofer, P., Niemetz., Schiling, R.G. and Grosse, G. 2001. Biosynthésis and subcellular distribution of hydrolysable tannins. *Phytochemistry*, 57: 951-927.

Goubau.P, et Gompel.aVan, (2000), repères en Microbiologie, Garont, 3^{ème} édition, Belgique, 345 : 85, 250, 253, 254.

Grosjen Jérôme, Clavé Danielle, Archambaud Maryse, Pasquier.C, (2009), bactériologie et virologie pratique, éditon De Boeck, 234: 166.

Godet j.D. 1991. Arbres et arbustes aux quatre saisons. Les guides pratiques du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé, 215 : 96- 170.

Gubernatis A. 1882. La mythologie des plantes ou des légendes du règne végétal. Editeur C. Reinwald Paris. Tome II, 166-169.

Garnier G., Bezanger-Beauquesne L., et al. 1961. Ressources médicinales de la flore française. Editions Vigot Frères. Tome II, 1511:838-842.



Herisset, A . 1974. L'arsenal et l'herboristerie (simples et formules) et la phytothérapie, les actualités pharmaceutique.

Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B. et Legrand, M. 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*, 16 (6) : 1446-1465.

Hollman, P.C.H. 2001. Evidence for health benefits of plant phenols : local or systemic effects?. *J. Sci. Food Agric*, 81: 842-852.

Heimeur, N., Idrissi, L. et Serghini, M.A. 2004. Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *The moroccan society of Biology in Canada*, 3 (1) : 37-42.

Heller, R., Esmault, R. et Lance, C. 1998. *Physiologie Végétale*. 6ème édition. Dunod, Paris, 329 : 290.

Halvorsen BL, Holte K, et al. 2002, .A systematic screening of total antioxidants in dietary plants.. *J Nutr* , 132(3):461-71.

Poyrazoglu E, Gökmen V, Artik N. 2002. *Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (Punica granatum L.) grown in Turkey*. *Journal of food composition and analysis*, 15:567-75.

Huang, M.D., Dheng, C.X., Li, S.X., Mai, X.H., Tan W.C., and Szetu, J. 1989. Studies on population dynamics and control strategy of the *Citrus* leafminer. *Acta Entomologica Sinica*, 32 : (1) : 58-67.



Isrin, P., 2001, Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse.



Kraus, T.E.C., Zasoski, R.J. and Dahlgren, R.A. 2004. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin contents in foliage and roots. *Plant and Soil*, 262 (1-2): 95–109.

Kirkman S, Briscoe VJ, Clark N, Florez H, Haas LB, Halter JB, Huang ES, Korytowski MT, Munshi MN, Odegard PS, Pratley RE, 2012, Swift CS. Diabetes in older adults: a consensus report. *Journal of the American Geriatric Society*, 60(12): 2342-2356.

Kening, Y. Vincenzo, D.L. et Normand, B. 1995. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant cell* , 7 : 1787-1799.

Kouki, M. and Manetas, Y. 2002. Resource availability affects differentially the levels of gallotannins and condensed tannins in *Ceratonia siliqua*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3035: 631–639.



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, 345 :4-5.

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

Martens, S., Knott, J., Seitz, C.A., Janvari, L., Yu, S.N. and Forkmann, G. 2003. Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 227 235.

Middleton, E.J.R., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on Mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev*, 52: 673-751.

Moringuschi, T., Kita, M., Hasegawa, S. and Omoru, M. 2003. Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis. *Food, Agriculture and Environment*, 1: 22-25.

Muller-Harvey, I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol*, 91: 3-20.

Martinez, J.J., Hernandez, F., Haddioui A., Legua, P., Martinez R., Ajal, A., Melgarejo, P., 2012. Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: Processing and fresh market aptitudes. *Sci. Hortic*, 140, 100-106.

Melgarejo, P. 1993. Seleccion y tipificacion varietal de granado (*Punica granatum* L.) [Ph.D. thesis]. Valencia. Spain: Univ. Politecnica de Valencia (UPV).

N

Nauciel Charles, Jean-Louis Valdé .(2005). Bactériologie médicale 2^{ème} édition, 345 : 12, 15,36, 52, 114.

P

Piquemal, G. 2008. Les flavonoïdes. Site web : <http://www.detoursante.com/>.

Peronny, S. 2005. La perception gustative et la consommation des tannins chez le Maki (*Lemur catta*). Thèse de doctorat. Muséum national d'histoire naturelle. Paris, 154pp.

Pilet.C, Botomai, Marchal.N, Calbashe. C et Person.Jm, 1987. Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne, Oin, 2^{ème} édition, Paris, 234 :142.

Perscott et Harly, Klein, Wiley, Sherwood, Woolverton. 2003. Microbiologie, de boeck, 3^{ème} édition, Bruxelles , 233 : 1075.

Planchon G., Collin e. 1875. Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale. Librairie F. Savy. Tome I, 222 :235-236-307-308.

R

Richte r, G. 1993. Métabolisme des végétaux : Physiologie et Biochimie. Presses polytechniques et universitaires. ISBN, 2-88074-231-5. pp525.

Rousseaux, M.C., Ballarés, C.L., Scopel, A.L., Searles, P.S. and Caldwell, M.M. 1998. Solar ultraviolet-B radiation affects plant-insect interactions in natural ecosystem of Tierra del Fuego (South Argentina). *Oecologia*, 116: 528-535.

Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Lòpez-Lefebvre, L.R., Sánche z, E. and Rome ro, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160: 315-321.



Shirley, B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis : ‘new’ functions for an ‘old’ pathway. *Trend in plant science reviews*, 11 (1) : 377-382.

Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., Van Tunen, A.J. and Bovy, A.G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 12: 3191-3195.

Schofield, P., Mbugua, D.M. and Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review : *Animal feed science and technology* , 91: 21-40.

Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ebadi, A., 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*)genotypes. *Sci. Hortic* , 111(1), 24-29.

Sumner MD et al. (2005). Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* , 96 (6): 810–814..

Sassi, M. 2008. Les plantes médicinales. *Dar el fikr. Tunis*, 78 : 34

Stalikas, C.D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *J. Sep. Sci* , 30: 3268–3295.

Skerman VDB, Gowan V, Sneath PHA,1980, Aproved Lists of Bacterical Names, *Int J Syst Bacteriol*, 123 : 28.

Swatsitang, P., Tucker, G., Robards, K. and Jardine, D. 2000. Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis*. *Analytical Chimica Acta*, 417 : 231-240.

Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Lavoisier, 23 :2- 10.

Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., Van Tunen, A.J. and Bovy, A.G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 12: 3191-3195.

Shorr RI, Ray WA, Daugherty JR, Griffi n MR, 1996. Individual sulfonylureas and serious hypoglycemia in older people. *J Am Geriatr Soc*, 44(7): 751-755.

Shirley, B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis : ‘new’ functions for an ‘old’ pathway. *Trend in plant science reviews*, 11 (1) : 377-382.

Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., Van Tunen, A.J. and Bovy, A.G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 12: 3191-3195.

Schofield, P., Mbugua, D.M. and Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review : *Animal feed science and technology*, 91: 21-40.

T

Tanguy, J. 1971. Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du Tabac souche commune (V.M.T). *physiol. Vég*, 9 (2) : 169-187.

Takos, A.M., Ubi, B.E., Robinson, S.P. and Xalker, A.R. 2006. Condensed tannins biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant Science*, 170: 487-499.

U

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

V

Verhoeven, M.E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., De Vos, C.H.R. and Colliver, S. 2002. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany*, 53 (377): 209 - 210.

Volpato S, Leveille SG, Blaum C, Fried LP, Guralnik JM, 2005. Risk Factors for Falls in Older Disabled Women With Diabetes: The Women's Health and Aging Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* , 60(12): 1539–1545.

W

Wollgast, J. et Anklam, E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao* : changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33: 423-447.

W-Erdman, J., Balentine, J.D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., H., Hollman, J.P.L., Keen C., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. and Burrowes, J. 2007. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*, 137 (3 supp1) : 718 -737.

X

Xie, D.Y. and Dixon, R.A. 2005. Proanthocyanidin biosynthesis- still more questions than answers. *Phytochemistry*, 66: 2127–2144.