

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:

DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE ALIMENTAIRE

OPTION : NUTRITION ET SCIENCE DES ALIMENTS

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique**

Par :

BACHIRI Naoual

Et

BENZIANE Youssra

Intitulé

**Etude phytochimique et valorisation de l'écorce
de *punica granatum L.* récolté de la région de
M'sila, en produit d'hygiène bucco-dentaire .**

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. RAHALI Abdallah	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Dr. ARIECH Mounira	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. GATOUACHE Mourad	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

DEDICACE

« Louange à Allah » le tout dans ma vie.

“Le succès dépend de la continuité de l’effort et de l’amour.

Notre existence n’a aucun sens, sans amour, sans rêver, et sans arriver..

Mais aussi on existe par notre pensée.”

Je dédie Mon travail à: Mes parents

***Mon héros** pour ses encouragements et son soutien moral et matériel. **Ma héroïne** pour son amour et ses prières un jour, je ne pourrai jamais traduire mes sentiments envers eux.*

*Ma grande sœur **Fahima**, ma fierté, Mon soutien, la source de ma volonté et ma confiance grâce à elle aujourd’hui je me suis arrivée là.*

*Le petit ange **Youmna**.*

*À la personne qui nous a quitté un jour, sans retour, qui vit toujours dans Mon cœur, **Fayçal**,
Mon frère, la miséricorde d’Allah soit sur toi.*

*Mon âme sœur **Aya**, Mes frères **Mokhtar, Anouar, Soufian, Souhib**.*

À tous les membres de ma famille ainsi qu’aux petits-enfants.

*Ma chère coupine **Fadoua**.*

*Ma collègue qui est devenue plus qu’un amie **Asma**.*

Mes collègues et mes amies pour les moments sympathiques qu’on a passé tout ensemble.

Moi et les personnes qui m’aiment.

*Et enfin à Ma binôme **Naoual**.*

Youssra

DEDICACE

Avant d'entamer mes propos, grâce et louange à Allah

le tout puissant de m'avoir accordé la santé, la patience et le courage pour réaliser ce travail.

*Aucune dédicace ne saurait suffisante pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices et votre soutien moral, mes parant, ma source de joie et de bonheur, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, à vous Mon père « **Bachiri Omar** » & Ma mère « **Daikache khadra** ».*

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Qu'Allah, le tout puissant, vous préserve et vous accorde la santé, longue vie et le bonheur.

*À mes chers sœurs « **Fadila, Salima, Fatna, Hayat** » : vous êtes toujours présentes pour les bons conseils qui étaient 'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle.*

*À mes frères « **Ahmed & Mohamed** », pour toutes encouragements et soutiens.*

*A mon oncle « **Daikache Ben Azouz** » et sa famille qui est ma deuxième famille.*

Je n'oublierai jamais votre présence et votre soutien.

À mes amis et famille les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Merci.

Et à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, pour que ce projet soit réalisé, je vous dis merci.

Naoual

REMERCIEMENTS

On remercie d'abord Allah de nous avoir donné la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous voudrions remercier chaleureusement notre enseignante et notre

Directrice de recherche, Mme ARIECHE MOUNIRA, pour avoir accepté de nous encadrer,

Pour ses efforts, ses orientations, sa patience et ses conseils durant la réalisation de ce travail.

Nos remerciements s'adressent aux membres du jury Dr. GATOUACHE M. et Dr. RAHALI A.

qui ont accepté de participer à

L'évaluation de ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à nos enseignants et à notre département de

«Biochimie et Microbiologie».

Nous tenons également à remercier l'ingénieur du laboratoire NOUI MEHIDI ILHAM, Pour son humilité et son aide.

Enfin, merci à tous ceux qui ont contribué à ce travail, de près ou de loin.

Sommaire

Résumé.....	i
Liste des abréviations	ii
Liste des figures	iii
Listes des tableaux	iv
Introduction	1
Chapitre I. Le grenadier <i>punica granatum L.</i>	3
I.1. Présentation	3
I.2. Historique	3
I.3. Biologie du grenadier	4
I.3.1. Description botanique	4
I.3.2. Classification botanique	6
I.4. Composition chimique des différents organes du grenadier	6
I.4.1. Les feuilles	6
I.4.2. Les fleurs	6
I.4.3. Fruits.....	6
I.5. La valeur nutritionnelle	7
I.6. Ecorce de grenade.....	7
I.6.1. Composition de l'écorce de grenade	8
I.6.2. Usage de l'écorce de grenade	8
I.7. Les différentes utilisations de <i>punica granatum L.</i>	9
I.7.1. Utilisation agro-alimentaire.....	9
I.7.2. Utilisation industriel.....	9
I.7.3. Utilisation médicinale	10
I.8. L'activité biologique et intérêt de <i>punica granatum L.</i>	10
I.8.1. Activité antioxydante	10

I.8.2.	Activité anti-inflammatoire	11
I.8.3.	Activité antimicrobienne et antifongique	11
I.9.	Valorisation des écorces du grenadier	12
Chapitre II.	Généralités sur les bains de bouche	14
II.1.	Définition du bain de bouche.....	14
II.2.	Classification du bain de bouche	14
II.2.1.	Bain du bouche à visé thérapeutique.....	14
II.2.2.	Bain du bouche à usage quotidienne	14
II.3.	Composition chimique de bain de bouche.....	14
II.4.	Les critères généraux d'un bain de bouche	15
II.5.	Bienfaits des bains de bouche.....	15
Chapitre III.	Matériels et méthodes.....	17
III.1.	Matériel végétale.....	17
III.2.	Extraction par macération	17
III.3.	Dosage des phénols totaux	18
III.4.	Dosage des flavonoïdes.....	18
III.5.	Dosage des tanins condensés	18
III.6.	Dosage des tanins hydrosables.....	19
III.7.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	19
III.8.	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	20
III.9.	Evaluation de l'activité antimicrobienne	20
III.10.	Evaluation de l'activité antifongique	21
III.11.	Formulation d'un gel d'hygiène bucco-dentaire.....	22
Chapitre IV.	Résultats et discussion.....	23
IV.1.	Rendements des extractions	23
IV.2.	Teneur en polyphénols, flavonoïdes et en tanins condensés et hydrolysables	24
IV.3.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	25

IV.4.	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	26
IV.5.	Evaluation de l'activité antimicrobienne	28
IV.6.	Evaluation de l'activité antifongique	29
IV.7.	Formulation d'un gel d'hygiène bucco-dentaire.....	30
	Conclusion.....	31
	Références bibliographiques	33

ملخص

تستخدم قشرة الرمان على نطاق واسع في الطب الجزائري التقليدي لعلاج امراض الجهاز الهضمي لانه مصدر مهم للمركبات الفينولية ذات النشاط العلاجي، كما ان لديه تأثير كبير على العديد من الانشطة البيولوجية وهناك القليل جدا من الوثائق حول التأثير المضاد للالتهابات لقشور الرمان نظرا لقدرتها على تخفيف الالم ومعالجة مختلف الالتهابات. لهذا السبب فان عملنا جزء من تثمين لحاء الرمان ودمجه في مكونات منتج نظافة الفم (غسول الفم). بعد الاستخلاص بطريقة النقع في مذيب هيدروميثانولي نقوم بتحديد المركبات الفينولية وهي البوليفينول والفلافونويد والعفص.... ، وكذلك تقييم النشاط المضاد للاكسدة، والنشاط المضاد للميكروبات والفطريات. باستخدام اربع سلالات بكتيرية وخمس فطريات. تهدف الدراسة ايضا الى اختبار النشاط المضاد للالتهابات لمستخلص الرمان عن طريق اختبار تثبيت الغشاء.

الكلمات المفتاحية

الرمان، المركبات الكيميائية النباتية، والأنشطة المضادة للميكروبات، والأنشطة المضادة للاكسدة، والأنشطة المضادة للالتهابات... الخ.

Abstract

The bark of *punica granatum L.* is widely used in traditional Algerian medicine to treat diseases of the digestive system because it is a very important source of phytochemical compounds with therapeutic activity and there is very little documentation on the anti-inflammatory effect in vitro of the bark of pomegranate due to their ability to relieve pain and treat various infections. For this reason, our work is part of the valorization of the bark of the pomegranate and its incorporation in the components of a product of oral hygiene (mouthwash). After an extraction by maceration in a hydromethanolic solvent by determining the tenures of phenolic compounds namely polyphenols, flavonoids, tannins condensed and hydrosable as well as the evaluation antioxidant activity, the anti microbial and antifungal activity antifungal activity using four bacterial strains (*Staphylococcus*, *Esherichia coli*, *Pseudomonas* and *Candida albicans*) and five fungi (*aspergillus flavus*, *aspergillus niger*, *fusaruim culmorum*, *umbelopsis ramanniana*, *aspergillus carbonarius*).

The study also aims to test the anti-inflammatory activity of the pomegranate extract by the memebranous stabilization test.

Keywords

Punica granatum L , phytochemical compounds, antimicrobial activities, antioxidant activities, anti-inflammatoryactivies...etc.

Résumé

L'écorce de *punica granatum L.* est largement utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter les maladies du système digestif car elle constitue une source très importante de composés phytochimiques à activité thérapeutique et il existe très peu de documentation sur l'effet anti-inflammatoire in vitro de l'écorce de grenade en raison de leur capacité à soulager la douleur et traiter diverses infections. Pour cette raison, notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de l'écorce de grenade et de son incorporation dans les composants d'un produit d'hygiène buccale (bain de bouche). Après une extraction par macération dans un solvant hydrométhanolique, nous déterminons les teneurs en composés phénoliques à savoir les poly phénols, les flavonoïdes, les tanins condensés et hydrosolubles ainsi que l'évaluation l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne et antifongique en utilisant quatre souches bactériennes (*Staphylococcus*, *Esherichia coli*, *Pseudomonas* et *Candida albicans*) et cinq champignons (*aspergillus flavus*, *aspergillus niger*, *fusarium culmorum*, *umbelopsis ramanniana*, *aspergillus carbonarius*).

L'étude a également pour but de tester l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de grenade par le test de stabilisation des membranes.

Mots clés

Punica granatum L., composés phytochimiques, activités antimicrobienne, activités antioxydante, activités anti inflammatoire...etc.

Liste des abréviations

APG II : Angiosperm Phylogeny Group II.

ATCC : American Type Culture Collection.

BDB : Bain de bouche.

BHT : Butylhydroxytoluène.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DPPH : 2,2- diphenyl-1 Picryl-hydrazyl.

EPG : Extrait de peau de grenade.

EAG/ MS : Equivalent d'acide gallique par rapport matière sèche.

EAT/ MS : Equivalent d'acide tannique par rapport matière sèche.

EQ/ MS : Equivalent de quercetine par rapport matière sèche.

Gram- : Gramme négatif.

Gram+ : Gramme positif.

IC50 : Concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition.

Kcal : Kilocalories.

LDL : Lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoprotein).

PDA : Potato Dextrose Agar.

pH : Potentiel d'hydrogène.

RBC : Red Blood Cell (Des globules rouge).

UFC : Unité Formant Colonie.

V.Q : Volume Quotidien.

V/V : Volume/ Volume.

% : Pourcentage.

Liste des figures

Figure 1. Arbre de grenade <i>punica granatum L.</i>	3
Figure 2. Feuilles lancéolées <i>Punica granatum L.</i>	4
Figure 3. Fleur de grenade.....	5
Figure 4. Fruit de grenade.	5
Figure 5. Principaux effets fonctionnels et médicinaux de la grenade.....	9
Figure 6. Ecorce de grenade (A), Poudre de grenade (B).	17
Figure 7. Réduction du radical DPPH.	19
Figure 8. Effet de l'extrait hydro-méthanolique de <i>Punica granatum L.</i> sur l'hémolyse induite.	27
Figure 9. Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (%).	29
Figure 10. Gel d'hygiène bucco-dentaire à base de l'écorce de <i>punica granatum L.</i> récolté de la région de M'sila.	30

Listes des tableaux

Tableau 1. Classification du <i>punica granatum L.</i>	6
Tableau 2. Valeur nutritionnelle de fruit.....	7
Tableau 3. Rendement d'extraction.....	23
Tableau 4. Teneurs des composés phénoliques.....	24
Tableau 5. Concentration inhibitrice IC50 (µg/ml) du radical DPPH.	26
Tableau 6. Résultat du test de l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'écorce de <i>punica granatum L.</i>	28

Introduction

Introduction

Le fruit du grenadier (*Punica granatum L.*) est l'un des plus anciens fruits comestibles connus, il est cultivé principalement dans la région méditerranéenne (**Heber et al., 2006**). Ecorce et ses fleurs sont utilisées depuis très longtemps par différentes civilisations anciennes pour leurs différentes activités thérapeutiques en particulier l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire et antioxydant.....etc.

Plusieurs chercheurs ont rapporté que les utilisations modernes des produits dérivés de la grenade comprennent maintenant la prévention et le traitement de nombreuses maladies (**M. K. Reddy et al., 2007**) ; (**Johanningsmeier & Harris, 2011**), car il est l'un des fruits les plus riches en composés phénoliques comme les poly phénols, flavonoïdes, les tannins hydro sables et condense (**Zaouay et al., 2012**).

Pourtant, la valorisation des sous-produits de la grenade est l'un des challenges D'actualité du développement durable. La plupart des sous-produits (écorce de fruits, les feuilles et les fleurs etc.) peuvent avoir un effet très important lorsqu'ils sont utilisés dans nombreuse secteurs tel que l'industrie alimentaire, cosmétique et sur toute pharmaceutique.

Pour cela, la valorisation des sous-produits par l'extraction, d'intérêt technologique et fonctionnel (épaississants, additif alimentaire, colorants, antioxydants, antibactériens, anti-inflammatoire ...) et également utilisé en cas des maladies et / ou hygiène bucco-dentaire.

La majorité des bains de bouche utilisée contiennent des produits chimiques et souvent des produits chimiques et souvent avec une forte teneur en alcool. Ce dernier déshydrate énormément, ce qui entraîne une bouche sèche dans laquelle les bactéries anaérobies se multiplient.

En Afrique, il existe une tradition d'hygiène buccodentaire basée sur l'utilisation de cure dents utilisant des plantes médicinales et l'utilisation de tisanes en bains de bouche pour la prise en charge des affections buccodentaires (**Tembely, 2021**).

Notre étude est motivée par la volonté de contribuer à la valorisation des écorces pour mettre au point des bains de bouche pouvant être utilisés dans l'hygiène buccodentaire et dans les traitements des affections buccodentaires.

Pour cela, notre manuscrit est organisé en quatre chapitres principaux.

L'étude bibliographique comporte les deux chapitres sur le grenadier (*punica granatum L.*) et sur les produits d'hygiène bucco-dentaire..

La partie expérimentale est divisée en deux chapitres: Matériels et méthodes et les principaux résultats et discussions.

Chapitre I

Le grenadier punica granatum L.

Chapitre I. Le grenadier *punica granatum L.*

I.1. Présentation

Le *punica granatum L.* ou le grenadier son nom est dérivé du latin « *granatum* » qui signifie «fruit à grain» (Fortin, 1996). Sont considérée comme un petit arbre ou plus clairement un grand arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée (Wald, 2009) l'arbre de grenade montré dans (Figure 1).



Figure 1. Arbre de grenade *punica granatum L.*

I.2. Historique

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

Originaire du moyen orient, il s'est propagé à travers la mer méditerranéenne, vers l'extrême orient en Chine et en Inde et dans le nouveau monde en Californie et Mexique (Lansky & Newman, 2007).

L'histoire de la grenade est liée au développement de l'humanité d'une manière impressionnante. La grenade a une place importante dans le Judaïsme, le Christianisme, l'islam, le *Buddhisme* et le *Zoroastrianism* (Lansky & Newman, 2007). Il est dit qu'elle avait 613

graines qui représentent les 613 commandements de la Torah, même si cela n'a pas été confirmé dans les temps modernes (Heber et al., 2006).

La grenade est souvent mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran et dans la religion musulmane, On raconte que le prophète Mahomet a encouragé ses disciples à manger la grenade pour chasser l'envie et la haine, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires. Outre la dimension symbolique dont elle était revêtue, la grenade était appréciée à l'époque pour les propriétés vermifuges de son écorce, mais aussi pour sa pulpe désaltérante et son aptitude à se conserver et à résister aux chocs, grâce à son écorce rigide. Cet arbre fruitier est aujourd'hui cultivé un peu partout dans le monde, sous les climats chauds et secs (Wald, 2009).

I.3. Biologie du grenadier

I.3.1. Description botanique

Les feuilles de *punica granatum L.* (Figure 2) sous forme caduques et lancéolées en spirales, aux branches hérissées de piquants (Iserin et al., 2001).



Figure 2. Feuilles lancéolées *Punica granatum L.*

Avec des fleurs portent également le nom de balaustes (Planchon, 1875) ; (Wald, 2009) présenté dans (Figure 3). Elles sont grandes, voyantes, rouge écarlates ou blanches, bisexuées, jusqu'à 4 cm de diamètre, solitaires ou en groupes à l'apex du rameau (Lim, 2013).



Figure 3. Fleur de grenade.

Sont fruit est souvent considérée comme une grosse baie ronde (**Figure 4**), de la taille d'une grosse orange (**Bock, 2013**). Intérieurement, le fruit divisé en compartiments contenant des graines rouges, roses ou blanches par une fin tissue jaune (**Lim, 2013**).



Figure 4. Fruit de grenade.

I.3.2. Classification botanique

Le classement botanique de l'espèce *punica granatum L.* du grenadier et son statut dans le règne végétal selon la dernière classification par (APG II system, 2003) cité par (Rana et al., 2010) montré dans le (Tableau 1).

Tableau 1. Classification du *punica granatum L.*

Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Lythraceae
Genre	Punica L.

I.4. Composition chimique des différents organes du grenadier

I.4.1. Les feuilles

Les feuilles de grenade contiennent des flavonoïdes tels que la lutéoline et l'apigénine. Ces derniers auront des propriétés anti-anxiété et ils contiennent également des tanins tels que la punicaline et la punicalagine (Lansky & Newman, 2007).

I.4.2. Les fleurs

Selon les mêmes auteurs (Lansky & Newman, 2007) Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique.

Lorsqu'il est essentiellement composé de poly phénols et les flavonoïdes essentiellement les anthocyanines aussi des constituants majeurs tel que : l'eau (85%), sucres (10%), principalement fructose et glucose, acides organiques (1,5%) principalement l'acide ascorbique, citrique et malique (Wald, 2009).

I.4.3. Fruits

La grenade est une bonne source de composés phénoliques bioactifs importants (Di Stefano et al., 2019).

I.5. La valeur nutritionnelle

Les grenades est une bonne source de vitamine K, ainsi que des fibres, de vitamine C, Acide folique, cuivre, potassium et de manganèse (**Tableau 2**). Le jus de grenade est particulièrement riche en Tanins, qui donnent de l'amertume au fruit. Il contient également des flavonoïdes, dont Anthocyanes, le pigment responsable de la couleur rouge du fruit. Les tanins et les anthocyanes contribuent à la forte activité antioxydante des grenades et de leurs jus. Le jus de grenade possède des propriétés anti-athérosclérotiques, anti-inflammatoires et anticancéreuses. En particulier, il empêchera le développement du cancer de la prostate. La plupart de ces effets serait attribuée à la forte activité antioxydante du jus (**Fortin, 2014**).

Tableau 2. Valeur nutritionnelle de fruit.

½ Fruit	Grenade crue (77 g)	
	Teneur	% V Q
Matière grasse	0,9 g	1 %
Glucides	14,5 g	5%
Fibre alimentaire	3,1 g	12%
Proteins	1,2 g	-
Vitamine K	12,7 µg	16%
Vitamine C	7,9 mg	13%
Folate	29 µg	13%
Cuivre	0,12 mg	6%
potassium	182 mg	5%
manganèse	0,09 mg	5%
Calories	64 Kcal	

I.6. Ecorce de grenade

L'écorce du fruit du grenadier est également appelée malicorium est une coque épaisse, de consistance dure, de saveur amère et astringente qui varie selon les cultivars poussant dans différentes régions du monde (**Wald, 2009**).

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

I.6.1. Composition de l'écorce de grenade

L'écorce de grenade a des teneurs élevées en substances phytochimiques. Des études ont montré que l'écorce renferme des composés bioactifs, notamment des acides phénoliques, des flavonoïdes et des tanins. Les principaux acides phénoliques primaires identifiés sont l'acide hydroxy benzoïque (Acide gallique et Acide ellagique) (Mena et al., 2012). Elle renferme également des acides hydroxy cinnamique, principalement l'Acide caféique et l'acide chlorogénique (Van Elswijk et al., 2004), des dérivés de flavones, molécules de coloration jaune, et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. Les tanins identifiés sont les ellagitanins (punicaline, la punicalagine, la granatine A et la granatine B) (Lansky & Newman, 2007). Ces tanins représentent jusqu'à 28% de la peau du fruit (Wald, 2009).

I.6.2. Usage de l'écorce de grenade

Depuis des milliers d'années, le grenadier, *punica granatum L.*, et ses fruits, graines et écorces sont utilisés pour leurs propriétés médicinales dans plusieurs régions de son origine.

La principale propriété de l'écorce de grenade utilisée en médecine populaire est son fort goût astringent, ce qui en fait un remède populaire sous forme de décoction (l'écorce est bouillie dans l'eau pendant 10 à 40 minutes) contre la dysenterie, la diarrhée, les aphtes, l'hygiène buccale (Olapour & Najafzadeh, 2010). La décoction peut être utilisée comme bain de bouche.

En médecine traditionnelle, il a été utilisé pour traiter une variété de maux. Les écorces de fruits traitent la diarrhée, arrêtent les saignements, guérir les ulcères (Jyotsana & Maity, 2010) contrôlent l'inflammation et traitent les troubles du système digestif et les maladies gastro-intestinales (Ghazaleh et al., 2013). La décoction d'écorce de grenade est très efficace par voie orale et intra vaginale pour prévenir la fertilité et l'avortement et pour améliorer divers problèmes (Mirdehghan & Rahemi, 2007).

En plus de ses utilisations traditionnelles à travers l'histoire, les grenades et leurs différentes parties sont utilisées comme médicaments dans le domaine pharmaceutique pour traiter une variété de maux (Figure 5). Ceux-ci peuvent agir comme antioxydants (Akhavan et al.), agents anti-tumoraux (Surveswaran et al., 2007) ou anti-hépatotoxiques (Wu et al., 2007) et améliorer la santé cardiovasculaire (Celik et al., 2009). Antibactérien (González-Sarrías et al., 2015) antiviral (Duman et al., 2009), anti-inflammatoire (Kanatt et al., 2010) et antidiabétique (Devatkal et al., 2010) ainsi que pour la protection des maladies dentaires, la prévention de la maladie d'Alzheimer (Olapour & Najafzadeh, 2010), l'infertilité chez l'homme, l'arthrite et l'obésité (Mirdehghan & Rahemi, 2007).

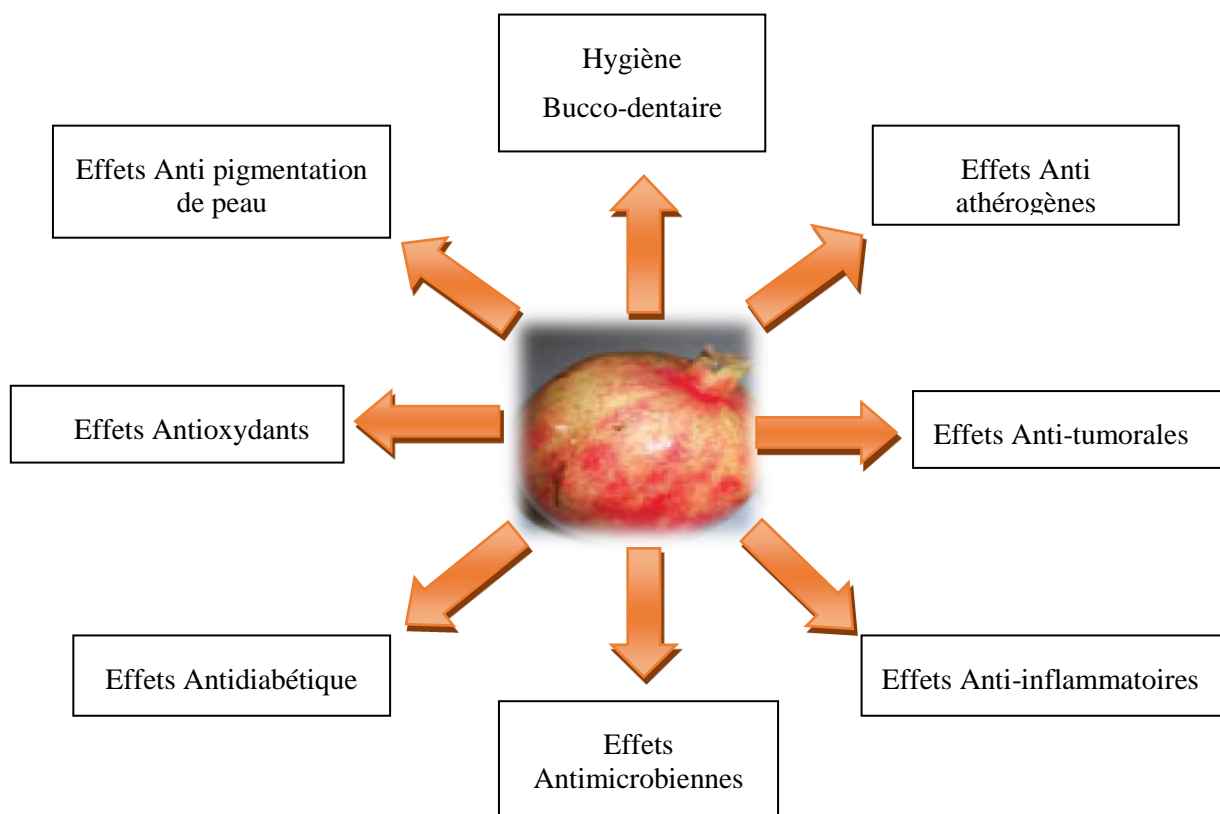


Figure 5. Principaux effets fonctionnels et médicinaux de la grenade (Viuda-Martos et al., 2010).

I.7. Les différentes utilisations de *punica granatum L.*

I.7.1. Utilisation agro-alimentaire

Le grenade peut être utilisé pour fabriquer divers produits alimentaires, notamment des grains entiers à consommer cru ou préparés de diverses manières, des jus, des sirops, des confitures, des gelées, des grains séchés, des fibres et des écorces séchées pour faire des infusions (comme des astringents ou des vermifuge). Les grains contiennent des acides gras, des anthocyanes, des tanins, des pinicalagines, des acides ellagiques, des vitamines, des minéraux, des fibres brutes, des sucres, des acides organiques, etc (Moreno & Valero, 1992).

I.7.2. Utilisation industriel

a) Les teintures naturelles

Le grenadier offre de nombreux principes tinctoriaux avec des couleurs très diverses comme le vert, une large gamme de jaune, de gris, de brun et de noir. Les parties utilisées dans cet arbre

sont essentiellement l'écorce du fruit, les fleurs, l'écorce de la racine, la tige et le tronc (**Saad, 2013**) ; (**Wald, 2009**).

b) Le tannage de cuir

L'écorce de grenade est utilisée pour tanner et teindre le cuir. On peut illustrer ce propos par le mélange de l'écorce de ce fruit avec l'alun pour obtenir la couleur jaune au cuir (**Saad, 2013**) ; (**Wald, 2009**).

L'arbre est également utilisé depuis l'Antiquité pour obtenir du bois et parmi les parties les plus utilisées, on trouve l'écorce de la racine (**Moreno & Valero, 1992**).

Par ailleurs, l'écorce de grenade est parfois utilisée à la place des noix de galle lors de la préparation de l'encre (**Cardon, 2014**).

I.7.3. Utilisation médicinale

Les fleurs, les feuilles, l'écorce et la sauce de grenade sont utilisés traditionnellement. Tous les composants du fruit *Punica granatum L.*, dont les tanins sont abondants, présentent des effets astringents relativement forts (**Shaygannia et al., 2016**).

Les fleurs de la plante ont été utilisées comme décoction en médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée simple, les pertes vaginales, et aussi cet extrait accompagné de l'écorce de grenade ont généralement été utilisés pour soulager l'inflammation du pancréas (**Lansky et al., 2000**).

Le fruit contient un fort tanin considéré comme un aliment amer est recommandé pour guérir les maladies de la vésicule biliaire, la diarrhée ordinaire, la dysenterie (**Schubert et al., 1999**). Et les troubles de l'estomac, ainsi que la teneur en tanin de la graine de grenade elle est généralement utilisée pour traiter les pertes vaginales des femmes et la cicatrisation des plaies.

Les composés alcaloïdes contenus dans les écorces de racines fraîches ou séchées ou dans les extraits éthanoliques de grenade sont utilisés pour éliminer les parasites intestinaux. En raison de ses qualités antibactériennes et anti-inflammatoires, elle est également employée en médecine traditionnelle (**Shaygannia et al., 2016**).

I.8. L'activité biologique et intérêt de *punica granatum L.*

I.8.1. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules qui aident à protéger notre corps du stress oxydatif (**Williamson, 2017**). L'activité antioxydante de l'écorce de grenade est due à sa richesse en polyphénols, à savoir les tanins hydrosolubles, notamment l'acide ellagique, la punicalagine, la

punicaline et l'acide gallique. Il a été démontré que l'écorce de fruit ont une capacité antioxydante plus forte que les arilles et les graines (**Ismail et al., 2012**).

En fait, certaines études ont rapporté que les composés phénoliques de l'écorce de grenade peuvent exercer une activité antioxydante en piégeant les radicaux libres (**SUN et al., 2017**) ; (**Sorrenti et al., 2019**) ainsi qu'en inhibant l'oxydation des LDL induite par le sulfate de cuivre (**Li et al., 2006**).

En outre, l'écorce de grenade peuvent inhiber la peroxydation lipidique, en réduisant les niveaux de lipides et de LDL peroxydés, en augmentant l'hydrolyse des lipides peroxydés (**Altunkaya, 2014**).

I.8.2. Activité anti-inflammatoire

Il a été démontré que la grenade exerce des effets anti-inflammatoires par différents mécanismes, notamment en inhibant l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique, en particulier la cyclooxygénase et la lipoxygénase (**Rahimi et al., 2012**).

Une autre étude réalisée par (**Yoganandam et al., 2010**) ont évalué l'efficacité de divers extraits (eau, éthanol, méthanol et acétate d'éthyle) d'écorce de fruit de *Punica granatum L.*

Les résultats des extraits méthanolique, éthyliques et d'acétate ont montré une meilleure activité que les deux autres extraits dus à une meilleure richesse en composés phénoliques.

Les extraits éthanoliques d'écorce et de graines de grenade ont également des effets positifs sur l'inflammation induite par la carragénine dans la patte de rats (**Radhika et al., 2011**).

I.8.3. Activité antimicrobienne et antifongique

L'activité antimicrobienne de la grenade et de ses dérivés a été démontrée dans de nombreuses études qui ont constaté l'inhibition de l'activité de nombreux microorganismes.

(**C. Reddy et al., 2007**), Ont démontré que différents extraits de grenade dans différents solvants ont une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Staphylococcus aureus*.

(**Al-Zoreky, 2009**), Ont démontré que l'extrait d'écorce de grenade est un puissant inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Yersinia enterocolitica*.

Cette activité antibactérienne explique la combinaison unique des tanins et des alcaloïdes de cette écorce, ainsi que leur action synergique (**Prashanth et al., 2001**).

Une étude réalisée par (**Vasconcelos et al., 2006**), compare l'utilisation d'un gel à base de miconazole, un agent antifongique à base d'imidazole, avec un gel contenant de la poudre d'écorce de grenade, sur l'adhésion de microorganismes aux infections bucco-dentaires. Trois types de bactéries, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* et *Streptococcus lentus*, et un type de levure, *Candida albicans*, sont soumis, seuls ou en associations, à l'action de ces gels. Ils mesurent alors la concentration minimum en principe actif qui permet d'inhiber l'adhésion de ces microorganismes à un support en verre, en présence de 5% de saccharose.

Les résultats de cette étude ont montré que le gel à base de l'écorce de grenade est plus efficace que celui à base de miconazole sur chacun de ces microorganismes analysés grâce à la présence de punicalagine et ils ont noté également que la peau de grenade se montre très efficace contre *Candida albicans* (**Wald, 2009**).

Selon l'étude de (**Kanoun et al., 2014**), Il a été démontré que l'extrait éthanolique d'écorce de grenade a un effet inhibiteur contre les souches *Ascochyta rabiei (pass) Labr* et *Fusarium oxysporum f.sp.Radicis –lycopersici* en fonction de la relation dose-effet.

I.9. Valorisation des écorces du grenadier

Les méthodes de valorisation sont souvent considérées comme des processus industriels, nécessitant la transformation de résidus ou de sous-produits alimentaires industriels afin de les réintroduire sur le marché en tant que nouveaux ingrédients ou produits Et l'utiliser dans le même domaine alimentaire ou thérapeutique et aussi cosmétique...etc. Au cours de ces processus, nous trouvons la valorisation des sous produit des fruits comme le grenade.

Les fruits de la grenade (feuilles, écorce et graines) sont riches en composés phénoliques (**Lairini et al., 2014**), Cette composition lui confère une variété de propriétés dans le domaine médical et dans l'industrie alimentaire. En effet, la recherche confirme que la grenade a des propriétés antidiabétiques (**Jafri et al., 2000**), antimicrobiennes (**Braga et al., 2005**), anti cancérigènes (**Lairini et al., 2014**). D'autres études ont montré que les grenades ont des propriétés anti oxydantes et antimicrobiennes qui empêchent la détérioration des aliments (**Viuda-Martos et al., 2011**). Cela justifie son utilisation comme conservateur naturel, car il existe actuellement une tendance à remplacer les substances chimiques et synthétiques à activité antimicrobienne et antioxydant par des substances naturelles présentes dans les fruits, les légumes et les herbes.

Dans ce contexte, notre travail sera présenté dont le but de valoriser l'écorce du grenadier, qui représente environ 50% du poids total du fruit en tant que source importante de composés bioactifs (**Calin, 2005**).

Chapitre II

Généralités sur les bains de bouche

Chapitre II. Généralités sur les bains de bouche

II.1. Définition du bain de bouche

Les bains de bouche sont des solutions ou des liquides utilisés pour rincer la bouche, ils contiennent généralement des agents antiseptiques qui permettent d'améliorer l'hygiène bucco-dentaire (**Eid & Alharbi, 2012**). Les bains de bouche sont destinés à être un complément aux bonnes pratiques d'hygiène buccale comme le brossage quotidien et la soie dentaire (**Mobio et al., 2018**).

II.2. Classification du bain de bouche

II.2.1. Bain du bouche à visé thérapeutique

Les antiseptiques sont des produits sous forme galénique liquide utilisée pour traiter une pathologie (**Pillon & Pillot, 2015**) grâce à l'activité antibactérienne, antifongique et antivirale contre les micro-organismes présents sur la peau et les muqueuses. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes (**Muster, 2008**).

Les BDB thérapeutiques peuvent être subdivisés en quatre sous-groupes selon leur spectre d'activité antimicrobienne et leur rémanence (**Muster, 2008**) ; (**Eley, 1999**).

- Les antiseptiques majeurs bactéricides à large spectre et à forte rémanence.
- Les antiseptiques majeurs bactéricides à large spectre et à faible rémanence.
- Les antiseptiques intermédiaires bactéricides à spectre étroit à faible rémanence.
- Les antiseptiques mineurs, bactériostatiques à spectre étroit.

II.2.2. Bain du bouche à usage quotidienne

Ce sont des produits d'hygiène bucco-dentaire pour une utilisation à long terme ou permanente. Ils aident à protéger la muqueuse buccale d'éventuelles infections et à protéger les dents peuvent prévenir les caries dentaires, ainsi que rafraîchir l'haleine ou lutter contre la mauvaise haleine (**Moran, 2008**).

II.3. Composition chimique de bain de bouche

Les bains de bouche sont composés des différents éléments suivants : (**Mobio et al., 2018**).

- Les principes actifs sont constitués de substances qui exercent un effet thérapeutique ou prophylatique vis à vis d'une pathologie ou d'une affection bucco-dentaire (**Jardim et al., 2009**). Les substances actives retrouvés dans les bains de bouche sont: la

chlorhexidine, les fluorures, les huiles essentielles, l'hexétidine, l'enoxolone, le triclosan etc.

- Les excipients des bains de bouche potentialisent l'action des substances actives, jouent le rôle de stabilisateur et souvent, améliorent le goût (**Claffey, 2003**). Les principaux excipients des bains de bouche sont : l'alcool, l'eau, les conservateurs, les arômes, les colorants, etc.

II.4. Les critères généraux d'un bain de bouche

Les bains de bouche sont caractérisés par certain nombre de facteur: (**Santos, 2003**).

- La composition de la molécule: le principe actif, les excipients et la concentration optimale.
- spectre d'activité antimicrobienne: le spectre peut être étroit ou large. Savoir si la molécule est bactéricide (connaître les bactéries qui sont sensibles), fongicide ou virucide.
- La rémanence: Capacité de la molécule à être absorbée par les tissus durs et mous de la cavité buccale et d'être relarguer plus tard. Cette rémanence peut être de longue durée ou de faible durée.
- La stabilité dans le temps: capacité de maintenir des concentrations efficaces pendant des périodes prolongées.
- Les effets pharmacologiques: la toxicité de la molécule et les effets secondaires.
- La résistance bactérienne.

II.5. Bienfaits des bains de bouche

Selon (**Pillon & Pillot, 2015**) :

- Les bains de bouche antiseptiques sont conçus pour inhiber la croissance bactérienne et réduire l'inflammation et la formation de plaque, prévenant ainsi l'infection et la gingivite.
- En raison de l'effet reminéralisant du fluor, les bains de bouche au fluor aident à renforcer l'émail des dents et à lutter contre la carie dentaire.
- Les bains de bouche utilisés pour lutter contre la mauvaise haleine empêchent la croissance des bactéries sur la langue et les gencives, ainsi que la production de gaz nauséabonds. Ainsi, les antiseptiques sont souvent associés à des agents qui inhibent la production de ces gaz et neutralisent les composés soufrés malodorants.

- Pour prévenir l'érosion dentaire causée par une consommation excessive d'aliments acides ou de sodas, les bains de bouche contenant de grandes quantités d'ions protègent les dents contre la perte de tissu dentaire.
- Pour soulager les hypersensibilités dentaires au chaud et au froid grâce à un agent qui obture les canalicules comme l'arginine ou le potassium utilisé comme agent désensibilisant des terminaisons nerveuses.

Chapitre III

MATERIEL ET METHODES

Chapitre III. Matériels et méthodes

III.1. Matériel végétale

Dans cette étude nous avons utilisé la poudre de l'écorce du grenadier (*punica granatum L.*) obtenu après la récolte des fruits de grenade de la région de m'sila en octobre 2021, après lavage et enlèvement des fruits suivi de la phase de séchage des écorces. On obtient alors 500g de poudre qui a été broyé et tamisé (**Figure 6**).

III.2. Extraction par macération

La macération fait selon le protocole crée par (**Kanoun et al., 2014**) avec largement modification, 10 g de poudre est mise à macérer dans la solution hydro-méthanoïque (100 ml d'eau distillé avec 100 ml méthanol à 97%) le mélange a été placé sous agitation magnétique pendant 18 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière. l'agitation magnétique est favorisée par l'utilisation d'un barreau magnétique, après 18 heures une décantation de l'échantillon a été effectuée, le surnageant a été filtré sous vide par le filtre (Whatman N° 3) le filtrat est concentré par un évaporateur rotatif couplé avec une pompe à vide contrôleur réglé à 40°C. après l'élimination totale du solvant, l'extrait obtenu placé dans l'étuve à 44 °C jusqu'à un poids constant.



Figure 6. Ecorce de grenade (A), Poudre de grenade (B).

- **Rendement d'extraction**

Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante : donnée par (**Falleh et al., 2008**) et citée par (**Mahmoudi et al., 2013**).

$$R (\%) = (M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}}) \times 100$$

Où:

R : Le rendement en %.

M_{ext} : La masse de l'extrait sec en g.

M_{éch} : La masse sèche de l'échantillon végétale en g.

III.3. Dosage des phénols totaux

Le contenu phénolique total de l'extrait était déterminé par la méthode Folin-Ciocalteu décrit par (Singleton & Rossi, 1965) cité par (Bougandoura & Bendimerad, 2013).

Mélanger 200 µl d'extrait avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (dilué 10 fois) et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7,5 % (Na₂CO₃). L'ensemble a été incubé à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité et la lecture est effectuée contre le blanc à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait sec (mg EAG/g ES).

III.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été estimé par la méthode de chlorure d'aluminium (AlCl₃) (Quettier-Deleu et al., 2000) avec quelques modifications : 1 ml de solution d'extrait hydro-méthanolique a été ajouté à 1 ml d'AlCl₃, à 2%. Après homogénéisation et incubation à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 430 nm. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent de quercétine par grammes d'extrait sec (mg EQ/g ES).

III.5. Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés est déterminée par la méthode de (Deshpande et al., 1986) avec quelques modifications. Une quantité de 350 µl de l'extrait est mélangé avec 1.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 %). Après agitation, 1,5ml de carbonate de sodium à 7,5 % (Na₂CO₃) sont ajoutés et le mélange incubé pendant 30 min à l'abri de lumière. L'absorbance est mesurée est à 760 nm. Les concentrations en tanins condensés ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide tannique. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide tannique par gramme d'extrait sec (mg EAT/g ES).

III.6. Dosage des tanins hydrosolubles

La teneur en tanins hydrosolubles est déterminée par la méthode de (Willis, 1998) avec quelques modifications. 200 µl d'extrait est mélangé avec 1 ml de réactif d'iodate de potassium à 2,5 % (KIO₃). Après Homogénéisation et incubation pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 550 nm. Les concentrations en tanins hydrosolubles ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide tannique. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide tannique par gramme d'extrait sec (mg EAT/g ES).

III.7. Evaluation de l'activité antioxydante

Le test de piégeage du radical DPPH

La capacité de piégeage des radicaux libres a été mesurée par la méthode 2,2 diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) comme décrit par (Moon & Shibamoto, 2009). Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits à réduire le radical DPPH°. Quand il réagit avec un composé antioxydant qui peut donner les protons hydrogènes. Le DPPH° est réduit en DPPH-H et change de couleur de violet vert le jaune (Figure 7), ceci se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 517 nm.

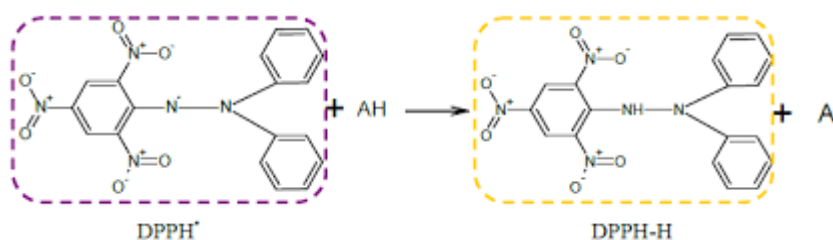


Figure 7. Réduction du radical DPPH.

Selon le protocole décrite par (Atere et al., 2018) avec quelques modifications. Mélangée 0,5ml de différentes concentration de l'extrait avec 1,45ml de la solution de DPPH 0.004 % préparé dans du méthanol dans un tube à essai. Après l'incubation des solutions pendant 30 min, à l'abri de la lumière, puis l'absorbance a été lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un contrôle et un blanc contenant de méthanol pure. Un standard de référence, Butylhydroxytoluène (BHT), est également été analysé en respectant la même procédure.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante:

$$I (\%) = [(Ac - Ae) / Ac] \times 100$$

Où:

I (%): Pourcentage d'inhibition.

Ac: Absorbance du contrôle.

Ae : Absorbance du l'échantillon.

La valeur IC50 (la concentration inhibitrice médiane) est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH, déterminée à partir la courbe du pourcentage de d'inhibition en fonction de la concentration.

III.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Teste de stabilisation de membrane des globules rouge

Pour préparer la suspension d'érythrocytes, du sang (5 ml) a été prélevé sur des volontaires sains par une ponction artérielle anticubitale. Afin d'obtenir les globules rouges, le précipité du sang centrifugé (3000 tr/ 10 min) a été lavé trois fois avec une solution de NaCl (154 mM) dans un tampon de phosphate de sodium (10 Mm ; pH 7,4). Puis, plus tard, 0,25 ml de suspension de globules rouges (RBC) stockée a été mélangée à 2,5 ml de solution hypotonique (50 mM NaCl) dans un tampon de phosphate de sodium (10 mM, pH 7,4). La solution hypotonique a été mélangée avec l'extrait testé ou avec le standard diclofénac sodum (1, 2 et 3 mg/mL). En outre, la solution hypotonique a été mélangée avec 0, 25 ml de globules rouges pour préparer l'échantillon de contrôle. Les échantillons ont été centrifugés (3000 tr/ 10 min) après 10 min d'incubation à température ambiante, et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm (Kherbache et al., 2020).

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé comme suit:

$$\% \text{ inhibition de l'hémolyse} = [(Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ test})/Abs \text{ contrôle}] \times 100$$

III.9. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Méthode de diffusion sur milieu gélose

Le test antibactérien est réalisé par la méthode des disques. Trois souches bactériennes de la collection de culture de type américain (ATCC) Gram+ et Gram- :

- ✓ *Pseudomonas* (ATCC 27853).
- ✓ *Escherichia coli* (ATCC 25922).
- ✓ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Levure et moisissure:

- ✓ *Candida albicans* (ATCC 444).

Ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait de l'écorce de *punica granatum L.* Toutes les souches bactériennes nous ont été fournies par l'institut Pasteur-Antenne de M'sila.

Suivez le protocole cité par (**KHRIBCH et al., 2018**) Avec une largement modifications.

Les souches bactériennes ont été réactivées afin d'obtenir des cultures jeunes en phase de croissance exponentielle. Elles ont été repiquées sur gélose nutritive et incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h. Une colonies de chaque bactérie a été prélevée et introduite dans 9 ml d'eau physiologique contenue dans un tube stérile. Après agitation, l'inoculum a été ajusté à une densité optique de 0.08 - 0.13 à une longueur d'onde de 620 nm. La concentration finale de l'inoculum est approximativement de l'ordre de $10^7 - 10^8$ ufc/ml .Ces suspensions serviront aux ensemencements par étalement sur milieu de culture Mueller Hinton et Sabouraud pour le *candida albicans* Dans des conditions aseptiques l'extrait a été dissous dans le méthanol, en raison de (v/v) et 60 µl de chaque concentration respectivement les suivants [75 ; 37,5 ; 18,75 ; 9,37 ; 4,68 ; 2,34] sont incorporés dans chaque disque. Après une pré-incubation de 1 heure à 4°C pour que l' puisse diffuser, une incubation à l'incubateur à 37°C pendant 24 heures a été faite pour les bactéries et 48 heures pour les levures.

L'extrait a été remplacé par le méthanol dans le témoin. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibition. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm (**Ela et al., 1996**).

III.10. Evaluation de l'activité antifongique

Le test d'activité antifongique c'est la méthode de diffusion de puits, on a testé l'effet de l'extrait sur les champignons [*aspergillus flavus* (NRRL3251), *aspergillus niger* (NRRL567), *fusarium culmorum* (FC1), *umbelopsis ramanniana* (NRRL1829), *aspergillus carbonarius* (NRRL369).] avec un emporte-pièce des puits de 7mm sont creusés dans la gélose PDA coulée dans les boîtes de Pétri (à trois points équidistants du centre et des bords de la boîte), ces puits ainsi formés sont remplis de 60µl de la solution préparée de l'extrait dissous dans le méthanol, pour réaliser une concentration finale de 300mg/ml. Un disque de culture fongique (âgée de 07

jours) a été découpé aseptiquement à l'aide d'un emporte-pièce de 7mm puis déposé au centre des boîtes. L'extrait a été remplacé par le méthanol dans les témoins. Les boîtes sont incubées à 25 °C pendant 7 jours.

La lecture des résultats a été faite après 5 à 7 jours d'incubation à 25 °C par mesure des diamètres de la colonie en croissance et le taux d'inhibition est mesuré selon la formule suivante: (Mohana et al., 2020).

$$I\% = [(Dc - Dt)/Dc] \times 100$$

Où

I%: Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

Dc: Diamètre de la colonie fongique du témoin (mm).

Dt: Diamètre de la colonie fongique traitée par l'extrait (mm).

III.11. Formulation d'un gel d'hygiène bucco-dentaire

- Le principe actif de ce gel est constitué de l'extrait aqueux de l'écorce de *punica granatum L*, qui se caractérise par des activités anti-microbienne, anti-inflammatoire et anti-oxydante et effet astringent, set effet est du à la présence d'une grande quantité des tanins dans les écorces de ce fruit.
- Le bicarbonate de sodium pour une halaine plus fraîche et le nettoyage et le blanchissement des dents.
- Excipients : Amidon pré-gélatinisé, saccharine sodique, polysorbate 20, eau purifiée, glycérol.

Chapitre IV

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre IV. Résultats et discussion

IV.1. Rendements des extractions

Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous et reporté dans le Tableau 3.

$$R (\%) = (M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}}) \times 100$$

Tableau 3. Rendement d'extraction.

Echantillon	La masse de l'échantillon (g)	La masse de l'extrait sec (g)	Rendement d'extraction (%)
<i>Punica granatum L</i>	10	2,8759	28,76

D'après les résultats obtenus, le rendement d'extraction est important, il est de 28,76% par rapport au poids initial de la poudre végétale. L'extrait obtenu est de couleur brune avec une légère odeur végétale. Des études ultérieures ont rapporté que les plantes ayant des rendements d'extraction élevés contiennent une forte teneur en composés phénoliques (**Lehtinen & Laakso, 1998**) ; (**Peyrat-Maillard et al., 2000**).

A partir des résultats obtenus, le rendement calculé est supérieur à celui rapporté par (**Okonogi et al., 2007**) une rendement d'extraction était 6,21% et inférieur que le rendement de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum L.* trouvé par (**Li et al., 2006**) était 31,5% Cette différence dans les rendements d'extraction est due à plusieurs facteurs entre autres la qualité d'échantillon, la distribution géographique (**Lahlou, 2004**).

Les variations du rendement en composés phénoliques entre les extraits peuvent être associées avec la polarité, la solubilité, ainsi que certains paramètres d'extraction comme la nature et la concentration du solvant, la température et la durée d'extraction (**Safdar et al., 2017**).

IV.2. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et en tanins condensés et hydrolysables

La spectrophotométrie permet de quantifier la teneur en composés phénoliques dans l'extrait hydrométhanolique de l'écorce de *Punica granatum L.* exprimées en milligramme équivalent acide gallique, quercitrine et acide tannique par gramme d'échantillon pour les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins condensés et hydrolysables respectivement.

La quantification a été faite en se référant aux courbes d'étalonnages réalisées dans les mêmes conditions (**Annexe 1, 2, 3, 4**). Les teneurs des composés phytochimiques de l'extrait hydrométhanolique de l'écorce de *Punica granatum L.* sont représentées dans le Tableau 4:

Tableau 4. Teneurs des composés phénoliques.

Les composés phénoliques	Les teneurs (mgEAG, Q, AT/g d'extrait)
Polyphénols	152,53 ± 3,04
Flavonoïdes	46,249 ± 2,83
Tannins condensés	9,899 ± 3,89
Tannins hydrolysables	374,4 ± 2,75

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydrométhanolique de l'écorce de grenade est riche en polyphénols totaux (152,53 ± 3,04 mg EAG/g de MS) et en tanins hydrolysables (374,4 ± 2,75 mg EAT/g MS). Sa composition en flavonoïdes et tannin condensé est relativement faible (46,249 ± 2,83; 9,899 ± 3,89 mg EQ/g MS).

- **Teneur en polyphénol**

Nos résultats sont significativement plus élevés que ceux rapportés par (**Elfalleh et al., 2012**) avec une teneur en polyphénols de (85,60 ± 4,87 mg EAG /g) pour l'extrait de l'écorce de grenade. De plus, ces résultats sont confirmés par les travaux de (Li et al., 2006) et ses collaborateurs qui ont rapporté une teneur en polyphénols de (249,4 ± 17,2 mg EAG/ g).

- **Teneur en flavonoïde**

La teneur en flavonoïdes totaux est variable et diffère d'un extrait à un autre.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (**Çam & Hışıl, 2010**) qui rapportent un taux très faible de flavonoïdes dans l'extrait de l'écorce de grenade. En 2006 (**Li et al., 2006**) et ses collaborateurs ont montré que la teneur en flavonoïdes dans l'extrait alcoolique était de (59,1 mg EQ/g), cette teneur est nettement supérieure à la valeur obtenue dans la présente étude ($46,249 \pm 2,83$ mg EQ/g MS). Nous concluons de cette comparaison que le choix de solvant influe sur la teneur de flavonoïde.

- **Teneur en tannin condensé**

Comme pour les autres classes phénoliques, les résultats ont montré que la teneur en tannins condensés est influencée par le solvant d'extraction.

Nos résultats sont similaires à ceux reportés par une étude fait en 2010 par (**Çam & Hışıl, 2010**) était ($9,2 \pm 1,0$) cette valeur estiment que le méthanol offre un extrait plus riche en tannin condensé que celui obtenu par d'autre solvant.

- **Teneur en tannin hydrosable**

Il a été rapporté que l'extrait de l'écorce de grenade est riche en ellagitanins qui sont des tanins hydrolysables (**Seeram et al., 2005**). En 2012 (**Elfalleh et al., 2012**) Ont montré que la teneur en tanins hydrolysables dans l'extrait méthanolique était de $139,63 \pm 4,25$ mg EAT/g. Ceci est significativement inférieur de la valeur obtenue dans notre étude ($374,4 \pm 2,75087$ mg EAT/g). Ceci explique que la solubilité des tannins dans le solvant hydrométhanolique plus élevé par rapport le solvant méthanolique.

Ces variations dans la teneur en composés phénoliques dépend du climat, la localisation géographique (**Ryan et al., 1999**), maturité, conditions de stockage et les différentes maladies qui peuvent affecter la plante (**Poyrazoğlu et al., 2002**). Les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensé, hydrolysables peuvent servir comme indicateurs importants des capacités thérapeutiques des plantes médicinales (**Viuda-Martos et al., 2011**).

IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Test de piégeage du radical DPPH

La méthode de piégeage du radical libre (DPPH) a été retenue pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait de grenade, car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical (**Bozin et al., 2008**).

L'activité antioxydante de l'extrait est exprimée en IC50. Selon (**Kadri et al., 2011**) plus la valeur de l'IC50 est faible et plus l'activité antioxydante est élevée.

Les concentrations inhibitrices IC₅₀ des différents antioxydants naturel et synthétique (BHT) sont représentées dans le Tableau ci-dessous:

Tableau 5. Concentration inhibitrice IC₅₀ (µg/ml) du radical DPPH.

	EPG	BHT
IC 50 (µg/ml)	5,49 ± 0,039	27,65 ± 0,901

L'extrait montre une IC₅₀ (5, 49 µg/ml) plus faible que le BHT (27, 65 µg/ml) ce qui signifie un pouvoir de piégeage du radical DPPH plus élevé. La richesse en phénols totaux notamment les tanins et les flavonoïdes peut expliquer la forte activité antioxydante (**Kulkarni et al., 2007**).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (**Kanatt et al., 2010**) qui ont trouvé que l'IC₅₀ (de radical DPPH) du BHT était 4 fois plus élevée que celle de l'extrait de l'écorce de grenade.

Les résultats de test de piégeage libre indiquent que les composants de l'extrait sont capables de piéger les radicaux libres par des mécanismes de don ou l'hydrogène, et peuvent donc être en mesure d'empêcher l'initiation de réactions en chaîne de radicaux libres nocives. La capacité de l'extrait de grenade à piéger différents radicaux libres dans différents systèmes suggère qu'ils peuvent être des agents thérapeutiques utiles dans le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux libres (**Abdollahzadeh et al., 2011**). Ceci est bénéfique pour la conservation des aliments, des préparations pharmaceutiques et des cosmétiques, car les réactions en chaîne des radicaux libres peuvent entraîner une oxydation des lipides et une détérioration ultérieure du produit (**Doleschall et al., 2002**).

IV.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Stabilisation de la membrane des globules rouges

Les résultats des pourcentages de stabilisation de la membrane des globules rouges pour diclofinac et l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de *Punica granatum L.* indiqué dans l'histogramme (**Figure 8**).

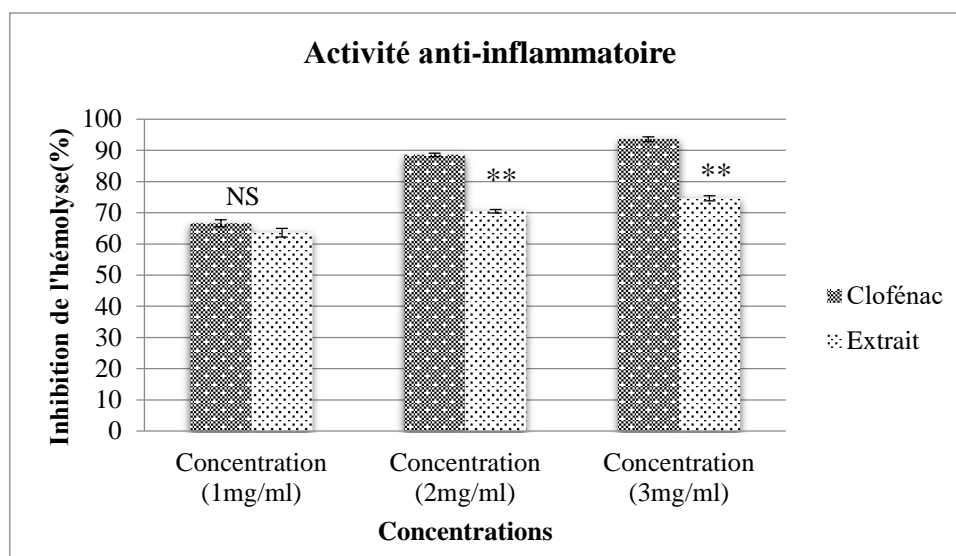


Figure 8. Effet de l'extrait hydro-méthanolique de *Punica granatum L.* sur l'hémolyse induite par l'hypotonie de la membrane érythrocytaire. Données représentent les moyennes \pm SD (n = 3). NS : non significatif ; ***p < 0,001 vs diclofénac sodium (test ANOVA et tests de comparaisons multiples de Dunnett).

D'après les résultats représentés dans l'histogramme de pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges, on observe que l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de grenade présente une inhibition élevée de l'hémolyse des globules rouges à différentes concentrations par rapport à diclofinac.

L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que l'extrait hydro-méthanolique d'écorce de *Punica granatum L.* possède une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges à différentes concentrations.

La stabilisation de la membrane des globules rouges a été utilisée comme méthode pour étudier l'activité anti-inflammatoire in vitro parce que la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale (Gueboudji et al., 2021).

Selon (Ruiz-Ruiz et al., 2017) ont rapporté que les polyphénols et les flavonoïdes exerçaient un important effet stabilisateur in vitro sur la membrane lysosomale. Ainsi, la présence des polyphénols, flavonoïdes et les acides phénoliques dans les extraits de l'écorce de grenade peut contribuer à l'effet anti-inflammatoire observé.

IV.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Méthode de diffusion sur milieu gélose

L'activité antibactérienne de l'extrait d'écorce de grenade a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait hydrométhanolique à tester vis-à-vis quatre souches bactériennes. Les résultats obtenus sont montrés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Résultat du test de l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'écorce de *punica granatum L.*

Souche	Concentration de l'extrait (mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Normes selon Ponce et al., 2003 (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923). Gram +	75,5	20,00 ± 1,00	>20
	37,5	14,00 ± 3,5	Extrêmement sensible
	18,75	12,67 ± 1,5	15 à 20
	9,37	06,00± 00,00	Très sensible
	4,68	06,00±00,00	8 à 15
	2,34	06,00±00,00	Sensible
	Témoin	06,00±00,00	Souche sensible avec une CMI= 18,75 mg/ml
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922). Gram -	Mêmes concentrations	Pas de zone d'inhibition	Souche non sensible
<i>Pseudomonas aurogenosa</i> (ATCC 27853). Gram -	Mêmes concentrations	Pas de zone d'inhibition	Souche non sensible
Levure : <i>Candida albicans</i> (ATCC 444).	Inhibition totale de croissance		

Les résultats ont montré une sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* vis-à-vis l'extrait de l'écorce de grenade (**annexe 7**).

D'autre part on remarque que cette sensibilité augmente avec l'augmentation de concentration de l'extrait, il est remarquable que la concentration 75,5 mg/ml montre l'effet

inhibiteur extrêmement élevée 20 mm par rapport aux autres concentrations (37,5 ; 18,75 et 9,37 mg/ml) qui montrent l'effet moins élevée (14mm ; 12,67mm ; 6mm) respectivement.

Grace aux résultats obtenus à partir des différentes concentrations, on détermine alors la concentration minimale inhibitrice (CMI= 18,75 mg/ml) qui inhibe la croissance de la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*.

Nos résultats pour les concentrations suivantes (75; 37,5 ; 18,75) sont légèrement supérieurs à ceux de (Lairini et al., 2014), qui enregistrent des diamètres d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* de (16,04mm, 13,00mm et 11,12mm) à différentes concentrations.

D'autre part, (Al-Zoreky, 2009) a trouvé une zone d'inhibition pour le staphylocoque d'un diamètre égal à 13mm. Et ils ont noté également que la peau de grenade se montre une inhibition totale contre *Candida albicans* (annexe 8).

Par contre les résultats ont montré qu'il n'y a pas de sensibilité des autres souches (*Escherichia coli* et *Pseudomonas*) vis-à-vis l'écorce de grenade. Ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries (annexe 9).

IV.6. Evaluation de l'activité antifongique

Les résultats de l'activité antifongique obtenue in vitro à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose montrent que l'activité antifongique de l'extrait de l'écorce de grenade varie en fonction des champignons testés (Annexe 10).

L'activité antifongique de l'extrait est exprimé en taux d'inhibition de la croissance de mycélium en pourcentage (Mohana et al., 2020) montré dans la figure ci-dessous :

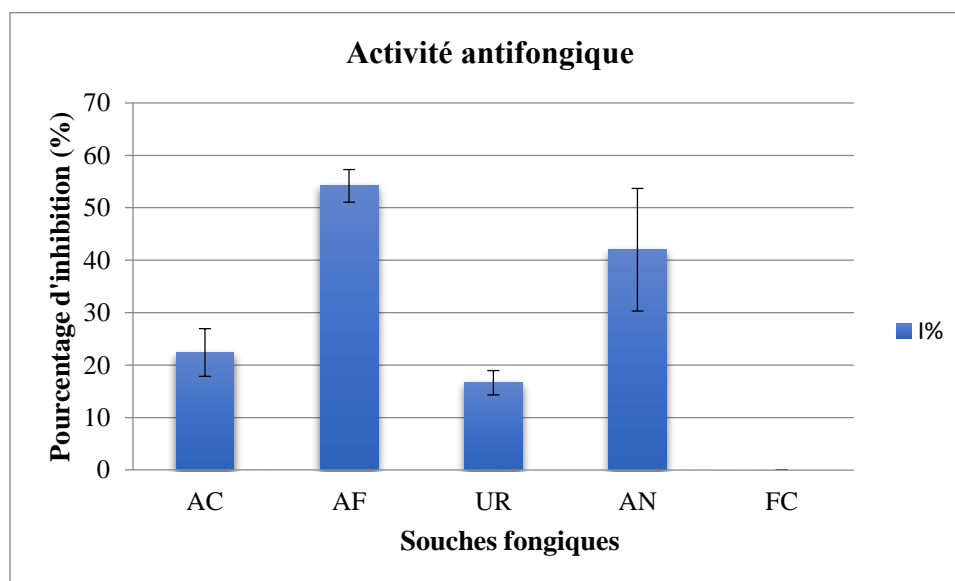


Figure 9. Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (%).

AC : *Aspergillus Carbonarius*, **AF :** *Aspergillus flavus*, **UR :** *Umbelopsis ramanniana*, **AN :** *Aspergillus niger*, **FC:** *Fusarium culmorum*.

Les résultats dans la (**Figure 9**). Montrent que l'extrait de l'écorce de grenade possède une activité antifongique remarquable sur toutes les champignons étudiées sauf pour un type de champignon. En effet, l'activité la plus intense a été enregistrée pour (*A. Flafus*) avec un taux d'inhibition de 54,31 % et un diamètre 35,33 mm, suivie par (*Aspergillus Niger*) avec un taux d'inhibition de 42,47 % et diamètre 43,33 mm et ensuit (*A. Carbonarius*) avec un 22,60 % et diamètre 59,33. Enfin, l'activité la plus faible a été enregistrée pour (*Umbelopsis Ramanniana*) avec un taux d'inhibition de 16.66 % et diamètre 60mm.

Les différences d'activité antifongique dans l'écorce de grenade peuvent s'expliquer par les principaux composés bioactifs (ellagitanines et punicalagine) (**Gil et al., 2000**).

Ils constaté que le niveau de punicalagine corrèle de manière significative avec l'inhibition de la croissance des champignons (**Glazer et al., 2012**).

IV.7. Formulation d'un gel d'hygiène bucco-dentaire

- **Description du produit**

Gel d'Hygiène Bucco-Dentaire (**Figure 10**), il est 100% pures et naturelles, aide à préserver une hygiène buccale optimale des dents et de la gencive. Cette composition est à la base d'un extrait naturelle riche en tanins pour lutter contre les bactéries, les champignons, les levures et même les infections virales tels que les herpes (Antiseptique).

Il aide à soulager les gênes buccales (les rougeurs, les gonflements ainsi que les saignements des gencives sensibles et la mauvaise haleine) grâce à ses vertus calmantes et réparatrices (Analgésique, Anti-inflammatoire et asringent).



Figure 10. Gel d'hygiène bucco-dentaire à base de l'écorce de *punica granatum L.* récolté de la région de M'sila.

- **Caractéristiques techniques**

- Antiseptique, Anti-inflammatoire et astringent.

- **Objectifs du produit, et utilités**

- Il s'agit d'un anti-infectieux pour traitement oral local. Ce gel est indiqué dans le traitement des infections bactériennes à *Staphylococcus*, des mycoses et des candidoses de la cavité buccale.

- Soulage les douleurs liées aux états inflammatoires et ulcéreux de la muqueuse buccale.

- Hygiène bucco-dentaire.

CONCLUSION

Conclusion

Le présent travail avait pour l'objectif de valorisation de l'écorce de grenade qui sont des sources important de composés phénoliques avec une bonne activité antioxydant et antimicrobien ainsi que l'activité anti-inflammatoire.

De cette recherche, nous pouvons tirer les points suivants :

L'extraction des composés bioactifs par une combinaison de solvants (hydrométhanolique) a fourni un rendement élevé de 28% et par conséquent une teneur élevée en composés phénoliques avec 152,53 mg/g de polyphénols totaux, 374,4 mg/g de tanins hydrolysables et 46,249 mg/g, 9,899 mg/g de flavonoïdes et tanins condensés.

L'extrait de l'écorce de grenade à un pouvoir anti oxydante très élevé qui dépasse même celle des antioxydants synthétique comme le BHT elle est hautement dépendante de la concentration en poly phénol.

Un pouvoir de piégeage du radical DPPH élevé exprimé en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC₅₀ = 5,49 µg/ml) qui est supérieur à celui du BHT (IC₅₀ = 27,65 µg/ml).

Ces résultats ont montré que l'écorce du grenadier contient une quantité notable des composés phénoliques peut jouer un rôle majeur dans l'activité antioxydante et ont indiqué que ces écorces peut être utilisé comme source naturelle d'antioxydants.

L'évaluation des activités antimicrobienne et antifongique de l'extrait a été réalisée par une étude qualitative en milieu gelosé sur quatre souches bactériennes et cinq champignons.

- L'extrait de l'écorce de grenade n'a aucune activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas* qui sont des souches très résistantes.
- L'extrait possède une inhibition totale de l'activité antilevurienne contre *Candida albicans*.
- L'extrait de l'écorce de grenade montre une activité modérément inhibitrice contre la souche *Staphylococcus aureus* cette sensibilité augmente avec l'augmentation de concentration de l'extrait.
- l'extrait de l'écorce de grenade possède une activité antifongique remarquable sur toutes les champignons étudiées sauf pour un type de champignon (*fusarium culmorum*).

Les différences d'activité antifongique de la peau de grenade peuvent être expliquées les Principaux composés bioactifs (ellagitanins et punicalagines). Ils ont constaté que les niveaux de punicalagine étaient significativement associés à l'inhibition de la croissance fongique.

In vitro, l'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de grenade a révélé une activité anti-hémolytique importante. En comparaison avec diclofinac comme médicament anti inflammatoire.

En effet, la stabilisation de la membrane des globules rouges, par l'extrait hydrométhanolique de l'écorce pourrait être liée à leur composition chimique qui est riche en polyphénols et les flavonoïdes, possédant des propriétés anti inflammatoire.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait montre que cette substance possède un pouvoir anti-inflammatoire.

Grâce à ces résultats, on peut conclure que l'écorce de grenade sont considérées comme une source importante des composés phénoliques, molécules antioxydants avec des activités biologiques intéressants, ainsi que une activité anti-inflammatoire, ce qui valide son usage en médecine traditionnelle pour traiter la douleur et l'inflammation, et en pharmacologie comme les produits d'hygiène bucco-dentaire.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Abdollahzadeh, S., Mashouf, R., Mortazavi, H., Moghaddam, M., Roozbahani, N., & Vahedi, M. (2011). Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 8(1), 1.
2. Akhavan, H., Barzegar, M., Weidlich, H., & Zimmermann, B. F. Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars depend on extraction. *Journal of Chemistry*, 2015.
3. Al-Zoreky, N. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International journal of food microbiology*, 134(3), 244-248.
4. Altunkaya, A. (2014). Potential antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts and synergism with added phenolic antioxidants in a liposome system: a preliminary study. *Irish journal of Agricultural and food Research*, 121-131.
5. Atere, T., Akinloye, O., Ugbaja, R., Ojo, D., & Dealtry, G. (2018). In vitro antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of standardized extract of *Costus afer* leaf. *Food Science and Human Wellness*, 7(4), 266-272.
6. Bock, B. (2013). Tela Botanica: Base de données Nomenclature de la flore en France. *BDNFF*, 4p.
7. Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*(9), 14.
8. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111(4), 925-929.
9. Braga, L., Leite, A. A., Xavier, K. G., Takahashi, J., Bemquerer, M., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. (2005). Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian journal of microbiology*, 51(7), 541-547.
10. Calin, S. A et Carboneli, B, A.(2005). *La grenade cultivée en Espagne Punica lagine*.
11. Çam, M., & Hışıl, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food chemistry*, 123(3), 878-885.
12. Cardon, D. (2014). *Le monde des teintures naturelles*. Belin.
13. Celik, I., Temur, A., & Isik, I. (2009). Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 145-149.
14. Claffey, N. (2003). Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *Journal of clinical periodontology*, 30, 22-24.
15. Deshpande, S. S., Cheryan, M., Salunkhe, D., & Luh, B. S. (1986). Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 24(4), 401-449.
16. Devatkal, S. K., Narsaiah, K., & Borah, A. (2010). Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. *Meat Science*, 85(1), 155-159.
17. Di Stefano, V., Pitonzo, R., Novara, M. E., Bongiorno, D., Indelicato, S., Gentile, C., Avellone, G., Bognanni, R., Scandurra, S., & Melilli, M. G. (2019). Antioxidant activity and phenolic composition in pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes from south

- Italy by UHPLC–Orbitrap-MS approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1038-1045.
18. Doleschall, F., Kemény, Z., Recseg, K., & Kővári, K. (2002). A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *European journal of lipid science and technology*, 104(1), 14-18.
 19. Duman, A. D., Ozgen, M., Dayisoğlu, K. S., Erbil, N., & Durgac, C. (2009). Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*, 14(5), 1808-1817.
 20. Eid, M. A. A. S., & Alharbi, S. A. (2012). Bacterial Endotoxin Released by Different Types of Mouthwash. *World Applied Sciences Journal*, 20(2), 305-309.
 21. Ela, M. A., El-Shaer, N., & Ghanem, N. (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Die Pharmazie*, 51(12), 993-994.
 22. Eley, B. (1999). Antibacterial agents in the control of supragingival plaque—a review. *British dental journal*, 186(6), 286-296.
 23. Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., & Ferchichi, A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(32), 4724-4730.
 24. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
 25. Fortin, F. (1996). *L'encyclopédie visuelle des aliments*. Québec/Amérique.
 26. Fortin, J. (2014). *tous sur les fruits, les noix et les grains*
 27. Ghazaleh, M., Mohammad, S., Gholamreza, H., Mahnaz, K., & Mannan, H. (2013). Anti-ulcerogenic activity of the pomegranate peel (*Punica granatum*) methanol extract. *Food and Nutrition Sciences*, 2013.
 28. Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(10), 4581-4589.
 29. Glazer, I., Masaphy, S., Marciano, P., Bar-Ilan, I., Holland, D., Kerem, Z., & Amir, R. (2012). Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(19), 4841-4848.
 30. González-Sarriás, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M. Á., Tomé-Carneiro, J., Zafrilla, P., Mulero, J., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2015). Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *Journal of Functional Foods*, 19, 225-235.
 31. Gueboudji, Z., Kadi, K., & Nagaz, K. (2021, October). Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of Polyphenols from Algerian Monovarietal Olive Oil Mill Wastewaters. In Proceedings of the 9th Jordan International Chemical Engineering Conference (JICHEC9) (Vol. 12, p. 14).
 32. Heber, D., Schulman, R. N., & Seeram, N. P. (2006). *Pomegranates: ancient roots to modern medicine*. CRC press.

33. Iserin, P., Masson, M., Restellini, J., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., & Vican, P. (2001). Larousse des plantes médicinales: identification. *préparation, soins. 2ième édition Larousse, VUEF, pp13-16, 291-296.*
34. Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of ethnopharmacology, 143(2), 397-405.*
35. Jafri, M., Aslam, M., Javed, K., & Singh, S. (2000). Effect of Punica granatum Linn.(flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology, 70(3), 309-314.*
36. Jardim, J. J., Alves, L. S., & Maltz, M. (2009). The history and global market of oral home-care products. *Brazilian oral research, 23, 17-22.*
37. Johanningsmeier, S. D., & Harris, G. K. (2011). Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual review of food science and technology, 2, 181-201.*
38. Jyotsana, S., & Maity, A. (2010). Pomegranate phytochemicals: nutraceutical and therapeutical values. *Pomegranate. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol, 4, 56-76.*
39. Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of Marrubium vulgare L. essential oil from Tunisia. *African journal of biotechnology, 10(19), 3908-3914.*
40. Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International journal of food science & technology, 45(2), 216-222.*
41. Kanoun, K., Abbouni, B., Gabbés, S., Dellani, S., & Zizi, N. (2014). In-vitro antibacterial activity of Algerian pomegranate (Punica granatum linn) peels on some antibiotic resistant gram-negative and positive bacterial strains. *Middle-East J Sci Res, 21, 1579-1589.*
42. Kherbache, A., Senator, A., Laouicha, S., Al-Zoubi, R. M., & Bouriche, H. (2020). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of Helichrysum stoechas (L.) Moench extracts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 29, 101826.*
43. KHRIBCH, J., NASSIK, S., EL HOUADFI, M., ZRIRA, S., & OUKESSOU, M. (2018). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'Escherichia coli d'origine aviaire. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, 6(3), 300-307.*
44. Kulkarni, A. P., Mahal, H., Kapoor, S., & Aradhya, S. (2007). In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *Journal of agricultural and food chemistry, 55(4), 1491-1500.*
45. Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 18(6), 435-448.*
46. Lairini, S., Bouslamti, R., Zerrouq, F., & Farah, A. (2014). Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de Punica granatum par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante (Enhancement of the aqueous extract of the bark of Punica granatum fruit through the study of its antimicrobial and antioxidant activities). *J Mater Environ Sci, 5(S1), 2314-2318.*

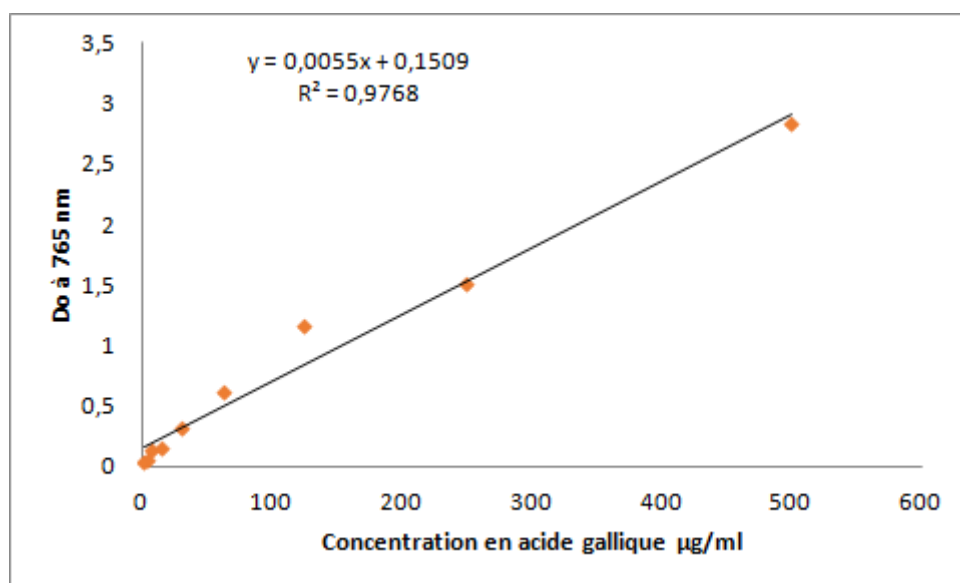
47. Lansky, E., Shubert, S., & Neeman, I. (2000). Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. *Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology*, 231-235.
48. Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, 109(2), 177-206.
49. Lehtinen, P., & Laakso, S. (1998). Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(12), 4842-4845.
50. Lemoine, E. (1998). *Guide des fruits du monde*. Delachaux et Niestle.
51. Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food chemistry*, 96(2), 254-260.
52. Lim, T. (2013). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 5, Fruits, Nigella Sativa. *Springer, Netherlands*. DOI, 10, 978-994.
53. Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (Cynara scolymus L.). *Nature & Technology*(9), 35.
54. Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A., & Del Rio, D. (2012). Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (Punica granatum L.) juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17(12), 14821-14840.
55. Mirdehghan, S. H., & Rahemi, M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (Punica granatum L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111(2), 120-127.
56. Mobio, G., Kamagaté, A., Koffi-Coulibaly, N., Ahnoux-Kouadio, A., & Koné, D. (2018). Bains De Bouche: Indications Et Règles De Prescription.
57. Mohana, B., Kameshwari, S., & Kumar, M. (2020). Antifungal Activity in Urginea indica Kunth.(Asparagaceae). *European Journal of Medicinal Plants*, 18-23.
58. Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
59. Moran, J. M. (2008). Home-use oral hygiene products: mouthrinses. *Periodontology* 2000, 48(1), 42-53.
60. Moreno, P. M., & Valero, R. M. (1992). *El granado*. Mundi-Prensa.
61. Muster, D. (2008). Antiseptiques en chirurgie dentaire et stomatologie. *EMC-Stomatologie Odontologie*, 28(190), 10.
62. Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food chemistry*, 103(3), 839-846.
63. Olapour, S., & Najafzadeh, H. (2010). Evaluation Analgesic, Anti-Inflammatory and Antiepileptic Effect of Hydro Alcoholic Peel Extract of" Punica granatum (pomegranate)". *Asian Journal of medical Sciences*, 2(6), 266-270.
64. Peyrat-Maillard, M., Bonnely, S., & Berset, C. (2000). Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51(4), 709-716.

65. Pillon, F., & Pillot, G. (2015). Bien utiliser les bains de bouche. *Actualités Pharmaceutiques*, 54(544), 37-39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actpha.2014.12.017>
66. Planchon, G. (1875). *Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale* (Vol. 1). F. Savy.
67. Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., & Artık, N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of food composition and analysis*, 15(5), 567-575.
68. Prashanth, D., Asha, M., & Amit, A. (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, 72(2), 171-173.
69. Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.-C., Bailleul, F., & Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*, 72(1-2), 35-42.
70. Radhika, S., Smila, K., & Muthezhilan, R. (2011). Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Punica granatum* Linn on alloxan induced rats. *World Journal of Medical Sciences*, 6(4), 178-182.
71. Rahimi, H. R., Arastoo, M., & Ostad, S. N. (2012). A comprehensive review of *Punica granatum* (pomegranate) properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 11(2), 385.
72. Rana, T. S., Narzary, D., & Ranade, S. A. (2010). Systematics and taxonomic disposition of the genus *Punica* L. *Pomegranate. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol*, 4(2), 19-25.
73. Reddy, C., Reddy, K., Prameela, M., Mangala, U., & Muralidharan, K. (2007). Identification of antifungal component in clove that inhibits *Aspergillus* spp. colonizing rice grains. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 37(1), 87-94.
74. Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta medica*, 53(05), 461-467.
75. Ruiz-Ruiz, J. C., Matus-Basto, A. J., Acereto-Escoffí, P., & Segura-Campos, M. R. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1424-1437.
76. Ryan, M. T., Müller, H., & Pfanner, N. (1999). Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20619-20627.
77. Saad, H. (2013). *Développement de bio-composites à base de fibres végétales et de colles écologiques* [Pau].
78. Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 488-500.
79. Santos, A. (2003). Evidence-based control of plaque and gingivitis. *Journal of clinical periodontology*, 30, 13-16.

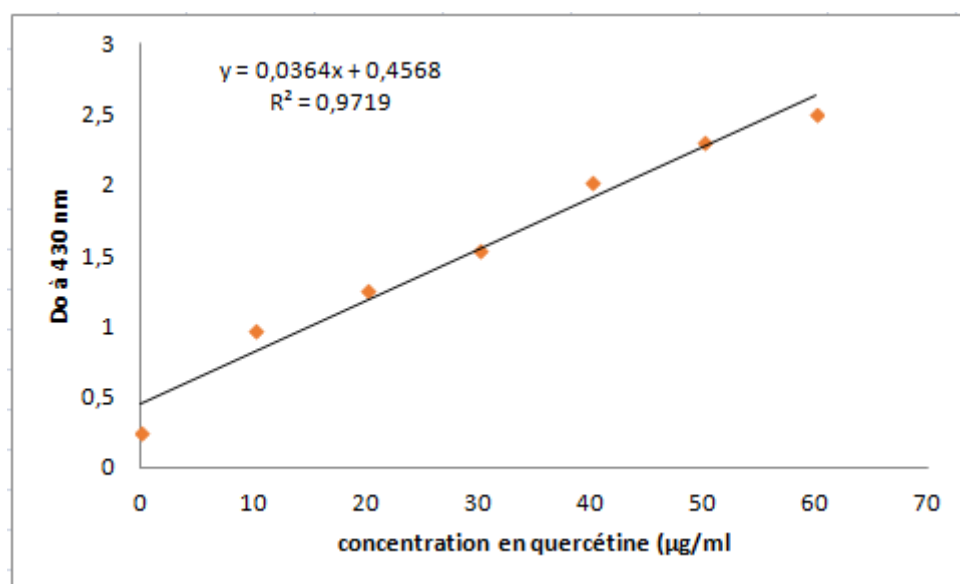
80. Schubert, S. Y., Lansky, E. P., & Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of ethnopharmacology*, 66(1), 11-17.
81. Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., & Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(6), 360-367.
82. Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., & Rafieian-Kopaei, M. (2016). A review study on *Punica granatum* L. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 21(3), 221-227.
83. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
84. Sorrenti, V., Randazzo, C. L., Caggia, C., Ballistreri, G., Romeo, F. V., Fabroni, S., Timpanaro, N., Raffaele, M., & Vanella, L. (2019). Beneficial effects of pomegranate peel extract and probiotics on pre-adipocyte differentiation. *Frontiers in microbiology*, 10, 660.
85. SUN, Y.-q., Xin, T., MEN, X.-m., XU, Z.-w., & Tian, W. (2017). In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *Journal of integrative agriculture*, 16(8), 1808-1818.
86. Surveswaran, S., Cai, Y.-Z., Corke, H., & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food chemistry*, 102(3), 938-953.
87. Tembely, A. (2021). *Etude phytochimique et activité antiradicalaire de trois plantes pour la mise au point de bains de bouche USTTB*].
88. Van Elswijk, D. A., Schobel, U. P., Lansky, E. P., Irth, H., & van der Greef, J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65(2), 233-241.
89. Vasconcelos, L. C. d. S., Sampaio, F. C., Sampaio, M. C. C., Pereira, M. d. S. V., Higino, J. S., & Peixoto, M. H. P. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Brazilian Dental Journal*, 17, 223-227.
90. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44(5), 1217-1223.
91. Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(6), 635-654.
92. Wald, E. (2009). *Le grenadier (Punica granatum): plante historique et évolutions thérapeutiques récentes UHP-Université Henri Poincaré*].
93. Williamson, G. (2017). The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition bulletin*, 42(3), 226-235.

94. Willis, R. (1998). Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst*, 123(3), 435-439.
95. Wu, K., Feskanich, D., Fuchs, C. S., Willett, W. C., Hollis, B. W., & Giovannucci, E. L. (2007). A nested case-control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(14), 1120-1129.
96. Yoganandam, G. P., Ilango, K., & Sucharita, D. (2010). Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of various extracts of Punica granatum L.(Lythraceae). *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1260-1263.
97. Zahin, M., Aqil, F., & Ahmad, I. (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punica granatum L. peel extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(2), 99-107.
98. Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., & Mars, M. (2012). Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (Punica granatum L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 40, 81-89.

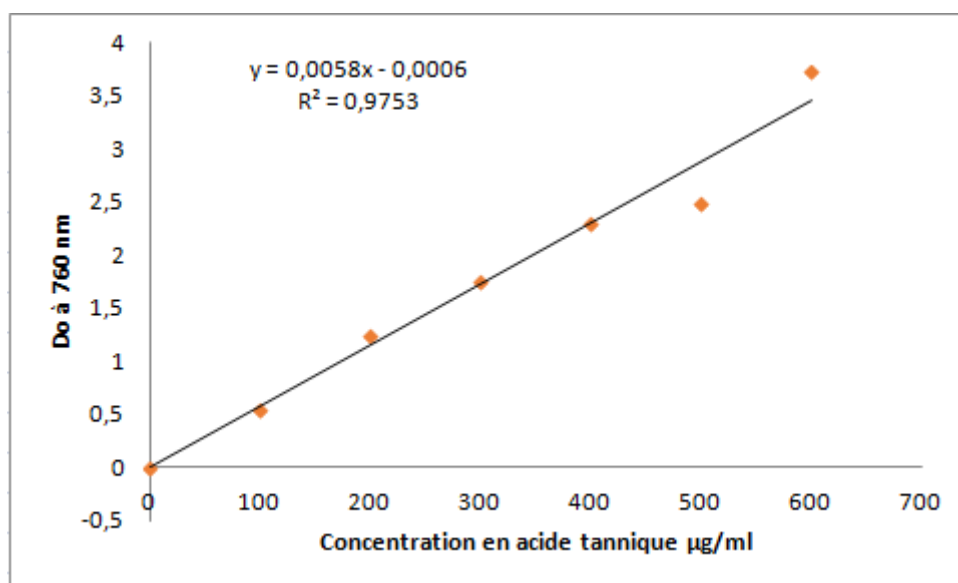
ANNEXES



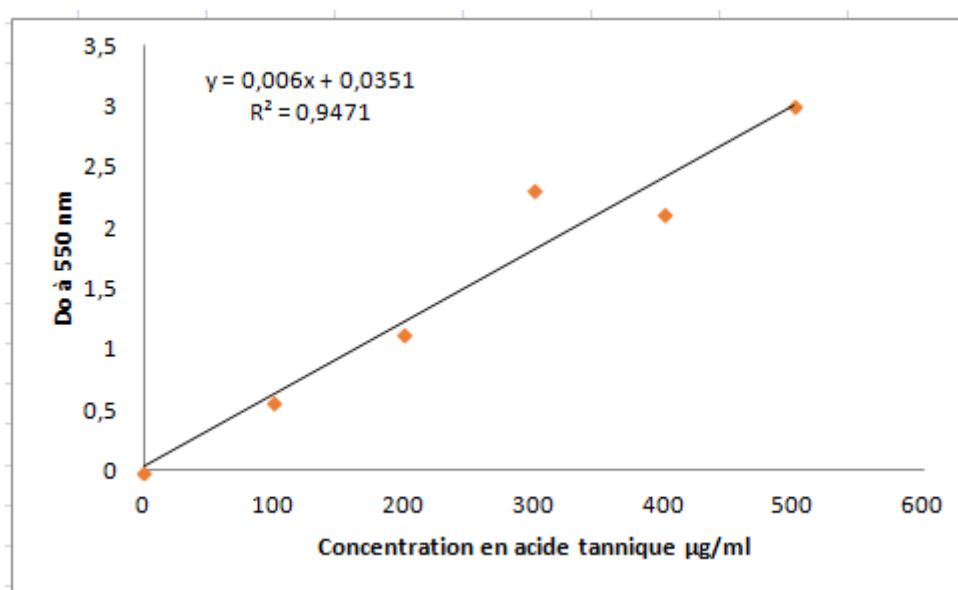
Annexe 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.



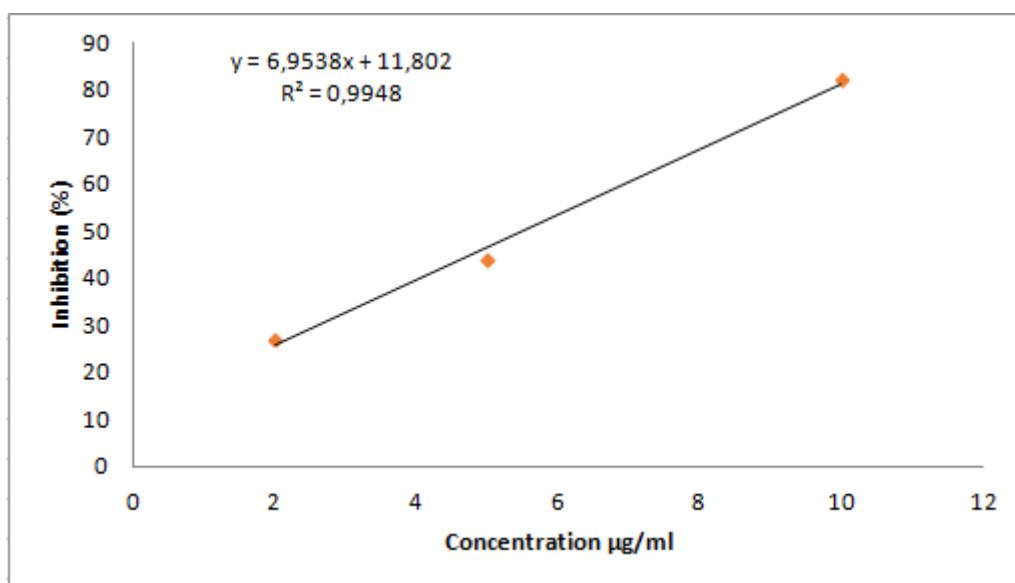
Annexe 2. Courbe d'étalonnage de Quercétine pour le dosage des flavonoïdes.



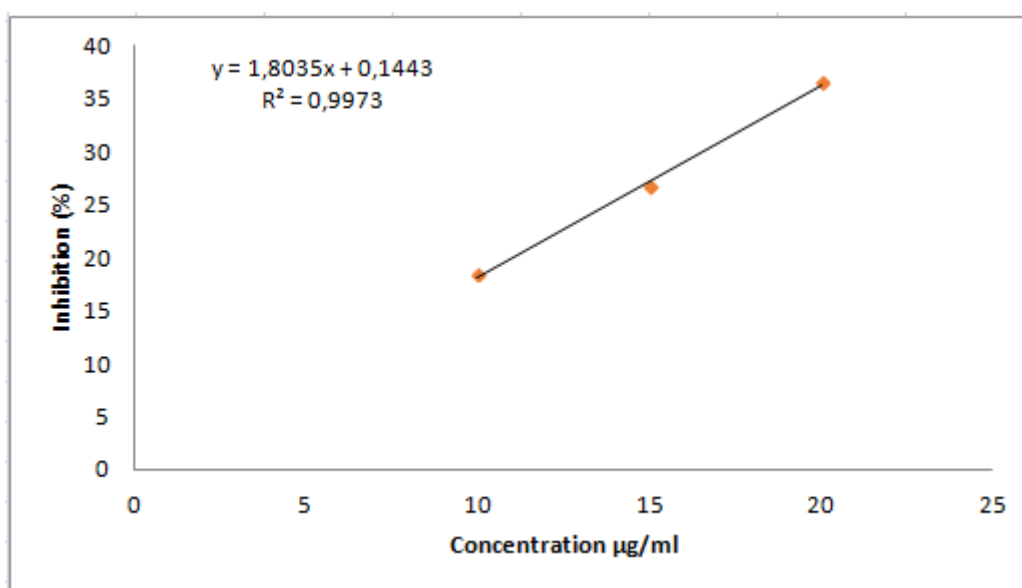
Annexe 3. Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins condensés.



Annexe 4. Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins hydrosolubles.



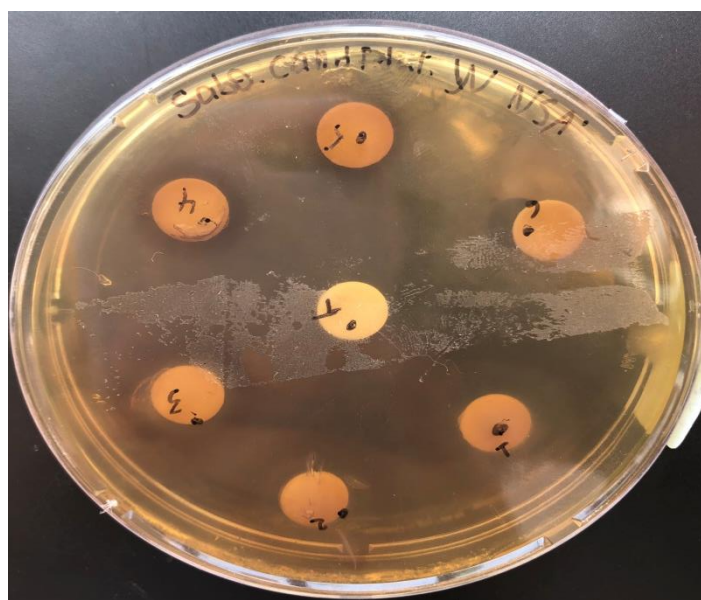
Annexe 5. Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des la concentration d'extrait.



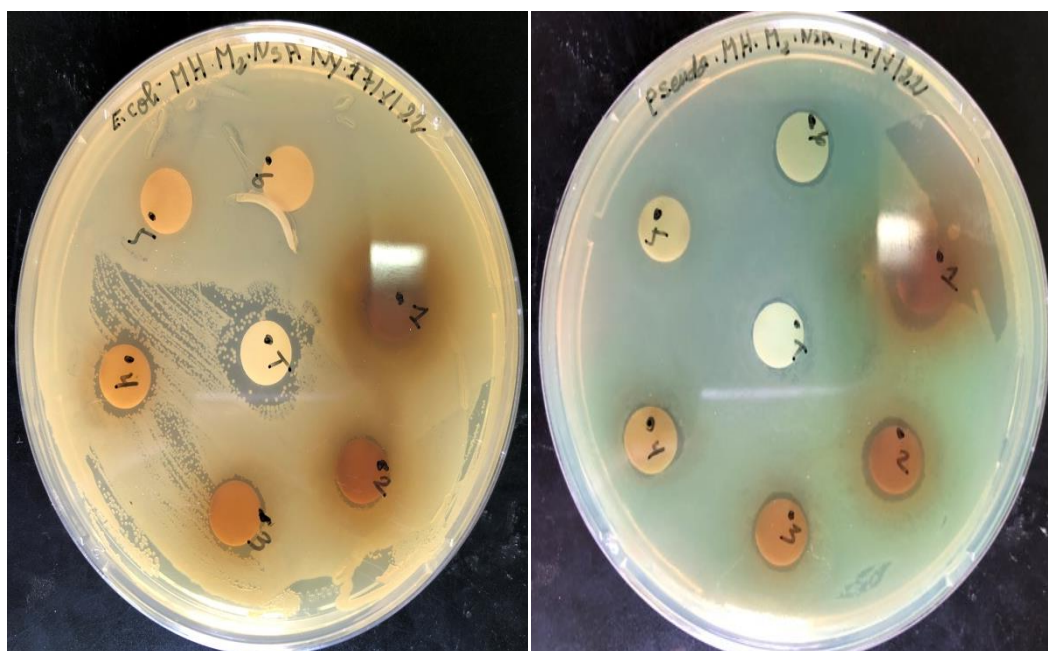
Annexe 6. Courbe du pourcentage d'inhibition du BHT en fonction des la concentration d'extrait.



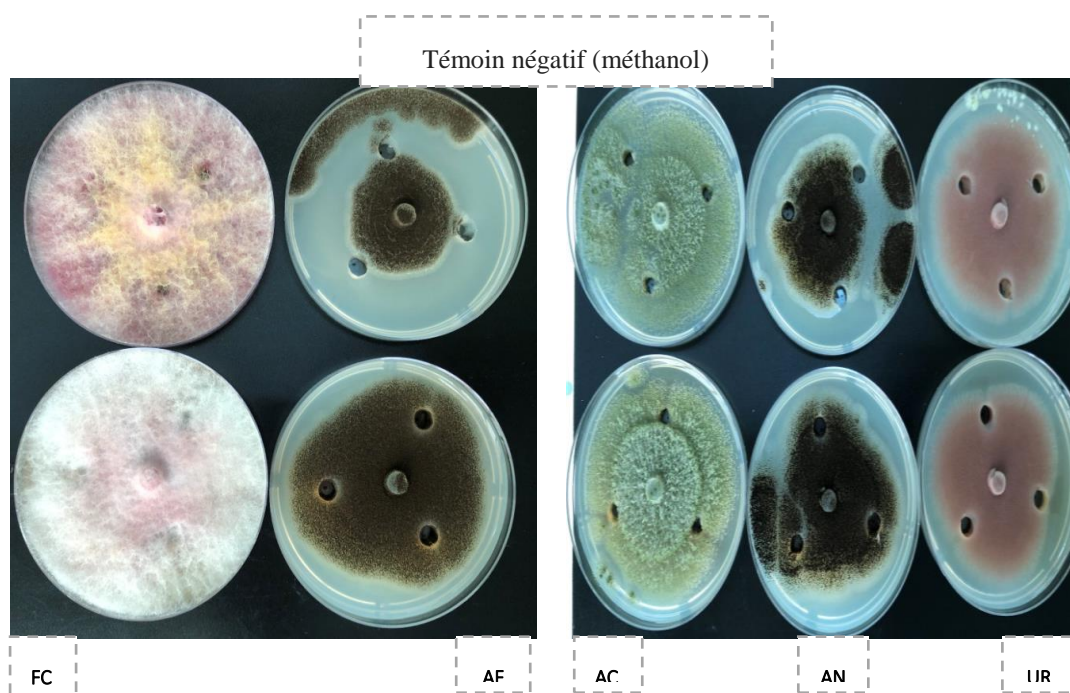
Annexe 7. Evaluation de l'activité antibactérienne d'extrait d'écorce grenade vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.



Annexe 8. Evaluation de l'activité antilevurérienne d'extrait d'écorce grenade vis-à-vis *Candida albicans*.



Annexe 9. Evaluation de l'activité antibactérienne d'extrait d'écorce grenade vis-à-vis *Escherichia coli* et *Pseudomonas*.



Annexe 10. Evaluation de l'activité antifongique d'extrait d'écorce grenade vis-à-vis les différents champignons a testes.