

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE 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 BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master II Académique
Par: CHERIFI Houda & BOUBAYA Samiya

Intitulé

**EVALUTION DES ACIDES PHENOLIQUES,
ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET
ANTIBACTERIENNE D'EXTRAIT DE *PUNICA
GRANATUM***

Soutenu devant le jury composé de :

Dr.BENSLAMA a.RAHIM	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Mme .BENCHIKH Dalila	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Mme. Rabeh Nour	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

DEDICACE



Avec l'aide d'Allah, le tout puissant, ce travail est achevé;

Je le dédie :

À toutes les personnes qui me sont chères. Aux deux êtres les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, et qui m'ont soutenue nuit et jour durant tout mon parcours.

Ma très chère mère qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissante, merci maman.

Mon très cher père qui m'a donné un magnifique modèle de volonté.

À mes chers frères et chères sœurs, à ma binôme Samiya et à tous mes amis.

À notre défunte amie et collègue **Hind gouadria** qui nous a quittée l'année passée à tout jamais, paix à son âme, puisse Dieu l'accueillir dans son vaste paradis.

HOUIDA

DEDICACE



Je le dédie :

A mes chers parents

A mes chers frères et chères sœurs

A mes familles

A ma binôme Houda et à tous mes amies.

A notre défunte amie et collègue **Hind gouadria** qui nous a quittée l'année passée à tout jamais, paix à son âme, puisse Dieu l'accueillir dans son vaste paradis.

Samiya

REMERCIEMENTS

*On remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Merci infiniment à notre encadreur **Mme .BENCHEIKH Dalila** qui a dirigé ce travail et veillé à ce qu'il soit mené à terme. Je tiens surtout à vous remercier pour vos conseils qui nous ont été d'une grande utilité.*

*Nous remercions les membres de jury: « **Dr.BENSLAMA a.RAHIM** » d'avoir présidé ce jury, et « **Mme. Rabeh Noura** » d'avoir accepté de juger notre modeste travail.*

Nos plus vifs remerciements vont à tous les membres de l'équipe des Laboratoires du Département pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives, ainsi qu'à tous nos collègues de promotion Microbiologie appliquée.

Sommaire

ملخص	I
Abstract	II
Résumé	III
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	VI
Listes des tableaux.....	VIII
Introduction	1

Partie I: Synthèse bibliographique

I.1. Phytothérapie	3
I.2. Plantes médicinales	3
I.3. La grenade (<i>Punica granatum L</i>)	3
I.3.1. Classification botanique	3
I.3.2. Description botanique.....	4
I.4. Utilisations en médecine traditionnelle	6
I.5. Stress oxydatif.....	6
I.6. Radicaux libres.....	7
I.7. Les antioxydants.....	7
I.8. Les défenses antioxydantes.....	7
I.9. Métabolites secondaires.....	8
I.10. Polyphénols	8
I.10.1. Les acides phénoliques	9
I.10.2. Flavonoïde.....	10
I.10.3. Les tannins.....	10
I.11. Agents antibactériens	11
I.12. Résistance des microorganismes aux antibiotiques	11
I.13. Mécanisme d'action des antibiotiques	11
I.14. Les bactéries étudiées	11
I.14.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
I.14.2. <i>Escherichia coli</i>	12
I.14.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12

Chapitre II: Matériel et méthode

II.1.	Matériel	13
II.1.1.	Matériel au laboratoire	13
II.1.2.	Matériel végétal	13
II.1.3.	Matériel microbiologique.....	13
II.1.4.	Les antibiotiques utilisés.....	14
II.2	Méthodes	14
II.2.1.	Préparation de l'extrait de l'écorce de <i>P. granatum</i>	14
II.3.	Analyses quantitatives.....	15
II.3.1.	Dosage des polyphénols totaux	15
II.3.2.	Dosage des flavonoïdes totaux	16
II.3.3.	Dosage des tannins	17
II.4.	Evaluation de l'activité antioxydante	15
II.5.	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	18
II.6.	Traitement statistique.....	20

Chapitre III: Résultats et discussions

III.1.	Rendement de l'extrait de <i>Punica granatum</i>	22
III.2.	Analyse quantitative	22
III.2.1.	Dosage des polyphénols totaux.....	22
III.2.2.	Dosage des flavonoïdes totaux :.....	22
III.2.3.	Dosage des tannins	22
III.3.	Activité antioxydante.....	22
III.3.1.	Test au DPPH.....	22
III.4.	Activité antibactérienne	22
III.4.1.	Test antibactérien	25
III.4.2.	L'antibiogramme.....	27
Conclusion		29

Références bibliographiques

Annexes

ملخص

Punica granatum L. أو شجرة الرمان هي شجرة تنتمي إلى عائلة *Lythraceae* تستخدم في الطب التقليدي والعديد من المجالات الأخرى لخصائصها العلاجية. يهدف هذا العمل إلى دراسة بعض الأنشطة البيولوجية في المختبر للمستخلص المائي لقشور *Punica granatum L*. بالإضافة إلى تقدير مجموع المركبات الفينولية و الفلافونويدات و الدباغ باستخدام مقياس الطيف الضوئي من جهة ، ومن جهة أخرى دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا بطريقة انتشار الأقراص ، ودراسة فعالية مضادات الأكسدة باستخدام اختبار DPPH.

بينت نتائج المستخلص المائي لنبته *Punica granatum L* بان لها مردود قدر ب: 23.1%. كما انه يحتوي على مركبات فينولية قدرت ب (1034.01±0.10 µg EAG/g Ps) باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu أما تقدير مركبات الفلافونويدات فكان باستخدام طريقة كلوريد الألومنيوم (AlCl₃) ومحتواها (7.47±0.007 µg EQ/mg Ps) ومحتوى الدباغ قدر ب (442.66±0.015 µg EAT/mg of extract). كما يُظهر اختبار DPPH للمستخلص المائي نشاطاً مضاداً للجذور الحرة 0.034 ± 0.04 mg / ml وبالتالي فإن مستخلص قشور فاكهة *Punica granatum* له قوة كبيرة كمضاد للأكسدة وتأثير ملحوظ كمضاد للميكروبات بتركيزات مختلفة: 250، 350 و 150 ملغ / مل على *Staphylococcus aureus* (قطر تثبيط 20 ، 17 ، 15 مم) و *E.coli* (11 مم) و *Pseudomonas aeruginosa* (8، 10 ، 7 مم). في الختام ، تكشف الدراسة الحالية عن أدلة بيولوجية تدعم استخدام فاكهة الرمان كمضاد للأكسدة ومضاد للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum L* ، مستخلصات مائية ، بوليفينول ، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للأكسدة.

Abstract

Punica granatum L. or the pomegranate tree is a tree belonging to the *Lythraceae* family. It is used in traditional medicine for their therapeutic properties. This work aims to study *in vitro* certain biological activities (antioxidant and antibacterial) on the one hand of the aqueous extract of *Punica granatum* bark, and on the other hand to determine the total phenolic compounds, flavonoids and tannins. Also the study of antibacterial activity by using the disc diffusion method, and the antioxidant activity was revealed by using the method: DPPH free radical scavenging.

The results showed that the yield of the aqueous extract of the bark of *Punica granatum L* (EQPG) is: 23.1%. Whereas, the phenolic compound content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, is estimated as $(1034.01 \pm 0.10 \mu\text{g EAG/g Ps})$. The flavonoids were evaluated by using the aluminum chloride method (AlCl_3), their content is $(7.47 \pm 0.007 \mu\text{g EQ/mg Ps})$ and the tannin content is $(442.66 \pm 0.015 \mu\text{g EAT/mg of extract})$. DPPH test shows an anti-free radical activity of the order of $0.034 \pm 0.048 \text{ mg / ml}$ and a remarkable antimicrobial effect from different concentrations: 150, 250 and 350 mg / ml of extract for the three strains *Staphylococcus aureus* (zone of inhibition 15, 17, 20mm); *E.coli* (11mm), and (7 , 8, 10mm) for *Pseudomonas aeruginosa*. In conclusion, this study reveals the biological effect of this plant and support the use of pomegranate fruit as an antioxidant, antibacterial. for their content of polyphenols, flavonoids, and tannins

Keywords: Aqueous extract, Biological activities, Flavonoids, *Punica granatum L.*, polyphenols, Tannins,

Résumé

Punica granatum L. ou le grenadier est un arbre appartenant à la famille des *Lythraceae*.

Il est utilisé en médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques. L'objectif de ce travail vise d'une part à étudier certaines activités biologiques *in vitro*: une activité antioxydante par l'utilisation de test DPPH et antibactérienne par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux d'écorce de *Punica granatum*, d'autre part la détermination des composés phénoliques totaux, flavonoïdes et les tannins.

Les résultats obtenus ont révélé que le rendement de l'extrait aqueux de l'écorce de *Punica granatum* L.(EQPG) est d'une valeur de 23.1%. La teneur en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de $(1034.01 \pm 0.10 \mu\text{g EAG/ g Ps})$. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode de chlorure d'aluminium (AlCl_3), leur teneur est de $(7.47 \pm 0.007 \mu\text{g EQ/mg Ps})$ et la teneur des tannins est de $(442.66 \pm 0.015 \mu\text{g EAT /mgd'extrait})$. En plus, le test de DPPH montre une activité anti-radicalaire qu'est de l'ordre de $0.034 \pm 0.048 \text{ mg/ml}$ et un effet remarquable antimicrobien à partir de différentes concentrations: 350, 250 et 150 mg /ml contre les trois souches *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition 15, 17, 20mm); *E.coli* (11mm), et (7, 8,10mm) pour *Pseudomonas aeruginosa*.

En conclusion, la présence des polyphénols, flavonoïdes, et des tannins révèle une preuve biologique qui soutient l'utilisation du fruit du grenadier comme un pouvoir d'antioxydant et antibactérien.

Mots clés : Activités biologiques, extraits aqueux, Flavonoïdes, *Punica granatum* L., Tannins, polyphénols,

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

BHT : Hydroxytoluène butylé

DPPH : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent en acide gallique

EAT : Equivalent en acide tannique

EQ : Equivalent en quercétine

EQPG : Extrait aqueux de *Punica granatum*

EOA: Espèces oxygénées actives

ERO : Espèces Réactives Oxygénées

g : Gramme.

h : Heure

IC₅₀ : Concentration à 50% d'inhibition

OMS:Organisation Mondiale de la Santé

UFC: Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1: Photo réelle de l'arbre de <i>P.granatum</i>	4
Figure 2: Photo réelle des feuilles de <i>P.granatum</i>	4
Figure 3: Photo réelle des fleurs de <i>P.granatum</i>	5
Figure 4: Le stress oxydatif.....	6
Figure 5: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défense antioxydante.....	8
Figure 6: Classification des composés phénoliques	9
Figure 7: Structures chimique de l'acide hydroxybenzoïque (a) l'acide cinnamique (b).....	9
Figure 8: Squellette de base des flavonoides	10
Figure 9: l'écorce sèche de <i>P.granatum</i>	13
Figure 10: L'extraction et la filtration (Photo réelle)	15
Figure 11: Courbe standard de l'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux...	15
Figure 12: Courbe standard de la quercétine pour la détermination des flavonoïdes totaux (Moyenne ± SD).....	15
Figure 13: Courbe standard de l'acide tannique pour la détermination des tannins. (Moyenne ± SD).....	17
Figure 14: Principe de la méthode de diffusion en milieu gélosé	19
Figure 15: Les pourcentages d'inhibition de DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait aqueux.....	24
Figure 16: les zones d'inhibition de la croissance bactérienne (A:350 mg/ml, B:250mg/ml, C: 150mg/ml).....	26
Figure 17: L'antibiogramme des trois souches utilisées.....	22

Listes des tableaux

Tableau 1: Les antibiotiques utilisés comme témoins positifs.....	16
Tableau 2: Echelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne.	20
Tableau 3: La couleur, l'aspect et le rendement d'extrait de <i>Punica granatum</i>	22
Tableau 4: Teneur en polyphénols totaux d'extrait de <i>Punica granatum</i>	22
Tableau 5: Teneur en flavonoïdes totaux d'extrait de <i>Punica granatum</i>	22
Tableau 6: Teneur en tannins d'extrait de <i>Punica granatum</i>	23
Tableau 7: Valeurs d'IC50 de BHT et de l'extrait aqueux, Les valeurs présentent la moyenne de trois mesures \pm SD.....	22
Tableau 8: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance des trois bactéries.	22
Tableau 9: Diamètres des zones d'inhibition d'antibiogramme des trois souches utilisées.....	22

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme utilise les plantes comme source principale de nourriture, par la suite ceci s'est développé pour les utiliser comme médicaments et remèdes afin de soigner les différentes maladies, jusqu'à ce jour (**Damintoti et al., 2005**).

Les plantes sont encore destinées à la santé humaine malgré les efforts des chimistes qui essayent de synthétiser de nouvelles molécules. Il y a tendance à substituer les agents chimiques et synthétiques ayant une activité anti-microbiologique et antioxydante par des agents naturels présents dans les fruits, les légumes et les herbes aromatiques (**Ayala-Zaval et al., 2005**).

D'après des études statistiques, plus de 25% des médicaments dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes (**Damintoti et al., 2005**). L'emploi de ces plantes est très valorisé dans toutes les traditions médicales, il y a deux cent ans encore, les moyens thérapeutiques naturels étaient les seuls remèdes dont disposait l'humanité. Leur utilisation et leurs effets ont donc été minutieusement étudiés, documentés et développés (**Grunwald et Janick, 2006**).

Le grenadier ou le *Punica granatum* fait partie des espèces médicinales de la famille des *Lythraceae*. Ou *Punicaceae*. C'est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée (**Garnier et al., 1961**).

Le fruit de grenadine (feuille, écorce et graine) est riche en composés phénoliques (**Fournier, 1948**). Cette composition lui a attribué plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine agroalimentaire ; en effet des études ont confirmé que la grenade possède des propriétés antidiabétiques (**Jafri et al., 2000**) anti-microbiennes (**Braga et al., 2005**) et anticancérigènes (**Malik et al., 2005**). D'autres études ont montré que la grenade possède des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes contre la détérioration des produits alimentaires (**Navarro et al., 2011, Viuda-Martos et al., 2011 ; Silvestro et al., 2009**). Cela justifie son utilisation comme agent de conservation naturel actuellement.

Notre choix s'est porté sur le grenadier (*Punica granatum L.*). Toutefois, il existe plusieurs variétés en Algérie, nous avons opté pour une variété locale très répandue dans la région de Bordj- Bouarreridj (Ras-El-Oued).

Pour réaliser ce travail nous l'avons divisé en deux parties :

- 1^{ère} partie : partie théorique : généralité sur la plante, généralités sur les polyphénols et les antioxydants et le pouvoir antibactérien.

– 2^{ème} partie : partie pratique : dans cette partie on a évalué les composés phytochimiques et déterminé deux activités biologiques: l'activité antioxydante par le test DPPH, et l'activité antibactérienne vis-à-vis de trois souches bactériennes par le test de diffusion des disques.

Chapitre I
Synthèse
Bibliographique

I.1. Phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques: phuton et therapeia qui signifient respectivement "plante" et "traitement". La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes, qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe (**Wichtl et Anton, 2003**). La phytothérapie est l'une des plus vieilles médecines utilisées par toutes les ethnies à travers le monde. Selon l'OMS, on estime que la phytothérapie est utilisée par 70% de la population mondiale (**Eisenberg et al., 1998**).

I.2. Plantes médicinales

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schauenberg et Paris, 1977**). D'après la définition donnée par l'OMS, une plante médicinale est une plante ou un de ses organes qui contient des substances qui peuvent être employées dans un but thérapeutique ou qui sont des précurseurs pour la synthèse d'autres drogues utiles et dont ses propriétés thérapeutiques sont prouvées scientifiquement ou de manière empirique par l'emploi en médecine traditionnelle (**Amini, 2010**).

I.3. La grenade (*Punica granatum L*)

I.3.1. Classification botanique

Punica granatum L (la grenade, roman) est une plante indigène du Nord de l'Afrique et du Caucase, où elle est largement répartie dans les montagnes, mais aussi dans le Sud des États-Unis. Le nom Grenade vient du latin Pomum pomme et granatus signifiant plein des graines. Le nom botanique est dérivé de vieux français : grenade – grenade pomme. Il appartient à la famille des Lythraceae.

Embranchement: Spermaphytes

Sous-embranchement: Angiospermes

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Myrtales

Famille: Punicaceae

Genre: Punica

Espèce: *Punica granatum* L (Ashok, 2012).

I.3.2. Description botanique

I.3.2.1. Arbre

La grenade est un arbuste net et arrondi ou petit arbre pouvant atteindre 20 ou 30 pieds, mais plus souvent faisant 12 à 16 pieds de hauteur. Il est généralement à feuilles caduques, et dans certaines régions les feuilles persistent sur l'arbre. Le coffre est recouvert d'une écorce rouge-brune qui plus tard devient grise. Les branches sont raides, anguleuses et souvent épineuses. Il y a une forte tendance à drageonner de la base. Les grenades ont également une longue durée de vie. Leur vigueur décline après environ 15 années (Ashok, 2012).



Figure 1: Photo réelle de l'arbre de *P.granatum*

I.3.2.2. Feuilles

La grenade a de brillantes et coriaces feuilles étroites et lancéolées, ayant une jolie couleur rouge écarlate, blanche ou panachée (Ashok, 2012).



Figure 2: Photo réelle des feuilles de *P.granatum*

I.3.2.3. Les Fleurs

Mesurent plus d'un pouce de diamètre et ont 5 à 8 pétales froissées et sont d'un rouge, charnu, calice tubulaire qui persiste sur le fruit. Elles peuvent être solitaires ou groupées par deux ou trois aux extrémités des branches. La grenade est autogame et la pollinisation est croisée par les insectes. Cette Pollinisation croisée augmente la nouaison. Sans le vent la pollinisation est insignifiante (Ashok, 2012).



Figure 3: Photo réelle des fleurs de *P. granatum*

I.3.2.4. Les fruits

Le fruit est presque rond, de 1/2 à 5 pouces de large, et est couronné à la base par le calice proéminent. La peau ou l'écorce dure et coriace est généralement jaune recouverte de rose clair ou foncé ou d'un rouge vif. L'intérieur est séparé par des parois membraneuses et blanches, spongieuses et amères, et d'un tissu dans des compartiments remplis de sacs qui eux même sont remplis d'acide douce, juteuse, rouge rose ou pourpre voire blanchâtre. Dans chaque sac il y a des graines anguleuses, molles ou dures. Des températures élevées sont essentielles pendant la période de fructification pour obtenir une meilleure saveur. La grenade peut commencer à porter ses fruits 1 an après la plantation, mais en général c'est 2 à 3 ans après. Dans des conditions convenables le fruit doit mûrir environ 5 à 7 mois après la floraison (Ashok, 2012).

I.3.2.5. L'écorce

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 (Lanskyetal, 2007).

I.4. Utilisations en médecine traditionnelle

Les écorces des fruits sont appréciées comme astringents dans la diarrhée et la dysentérie (Sathyavati *et al.*1987).

Dans la médecine populaire, les préparations du péricarpe séché et du jus de fruit sont utilisées comme médicament oral dans le traitement des coliques, colites, leucorrhée, ménorragie, oxyurose, paralysie et rectocèle, et application externe sur le sein durci (duke et Ayensu,1985) et sur la région cervicale dans les oreillons (boulos, 1983) et les maux de tête (Ayensu, 1981). Un certain nombre d'actions thérapeutiques ont été décrit y compris vermifuge, taeniicide, astringent, antispasmodique, antihystérique, diurétique, carminatif, sudorifique, galactophorique et emménagogue (Bianchini et Corbetta, 1981). La peau de grenade est utilisée pour traiter les infections sexuelles masculines et féminines, mammite, acné, folliculite, hémorroïdes, dermatite allergique, tympanite et pour le traitement des maladies bucco-dentaires.

D'autres études de recherche ont montré que la grenade exerce des effets anti-athéromateux importants, antioxydant, anticancéreux, anti-inflammatoire, antibactérien, et des effets cardioprotecteurs. Les polyphénols qui existent dans la grenade ont des bienfaits pour la santé (Reddy, 2018).

I.5. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme une production excessive d'espèces réactives oxygénées qui ne peut être contrecarrée par l'action des antioxydants, mais aussi comme une perturbation de l'équilibre redox cellulaire. Les espèces réactives oxygénées/azotées sont représentées par le radical anion superoxyde, les radicaux hydroxyle, alcoxyle et peroxyde lipidique, l'oxyde nitrique et le peroxyde nitrite (Pisoschi et Pap, 2015; Smagaet *al.*, 2015).



Figure 4: Le stress oxydatif (Nasri et Hadje Brahim, 2014).

I.6. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante « libre » en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable (**Goudable et Favier, 1997**).

I.7. Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés qui inhibent ou retardent l'oxydation d'autres molécules en inhibant l'initiation ou la propagation de réactions en chaîne oxydantes. Il y a deux catégories de base d'antioxydants, à savoir, synthétique et naturel. En général, les antioxydants synthétiques sont composés avec des structures phénoliques de divers degrés de substitution alkyle, alors que les antioxydants naturels peuvent être des composés phénoliques (tocophérols, flavonoïdes et acides phénoliques), composés azotés (alcaloïdes, chlorophylle dérivés, acides aminés et amines), ou caroténoïdes ainsi que l'acide ascorbique (**Velioglu et al., 1998**).

I.8. Les défenses antioxydantes

Pour se protéger des effets délétères d'espèces oxygénées actives (EOA), l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Figure 5). On distingue deux sources d'antioxydants :

Source d'antioxydants exogènes:

Apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque.

Source d'antioxydants endogènes:

Se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (**Haleng et al., 2007**).

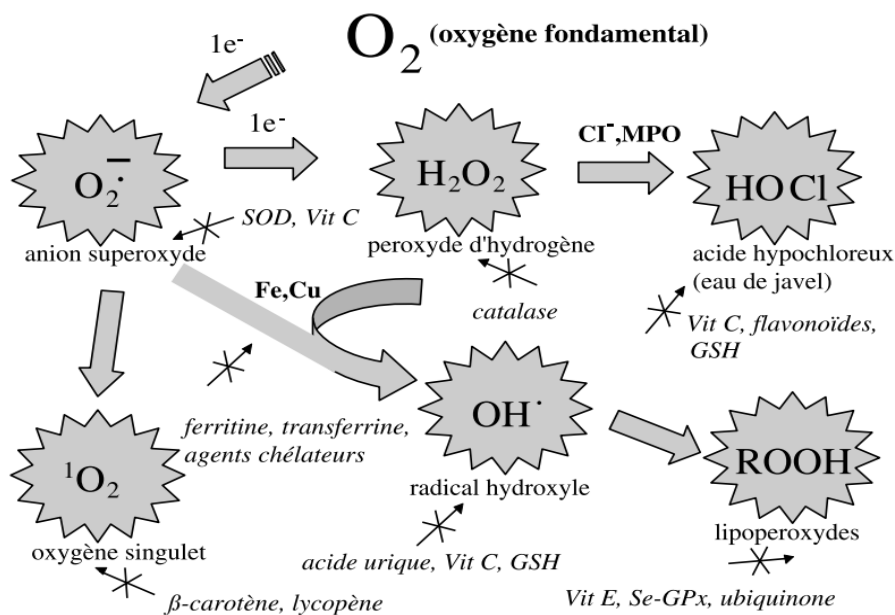


Figure 5: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défense antioxydante (Pincemail *et al.*, 2002).

I.9. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures (Kahlouche, 2014). Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité. Il existe plus de 200.000 métabolites secondaires classés selon leur classe chimique. Cependant depuis plusieurs années, ces substances appelées encore phytoprotecteurs ou encore principes actifs ont des effets positifs sur la santé et sont l'objet de nombreuses recherches scientifiques (Bruneton, 1999). Elles sont divisées principalement en trois grandes familles, les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (Bendif, 2017).

I.10. Polyphénols

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des molécules appartenant au métabolisme secondaire des plantes et jouant un rôle protecteur contre les menaces environnementales. Ces phytomicronutriments sont également responsables de plusieurs processus physiologiques tels que la maturation des fruits, la germination des graines et la croissance cellulaire (Boizot et Charpentier, 2006).

Ce sont aussi des pigments et donc responsables des couleurs et des teintes des différentes parties des plantes (fruits, fleurs et feuilles). Les polyphénols s'accumulent dans les plantes qualitativement et quantitativement selon les différentes parties de la plante et selon les espèces végétales (Lugasi, 2003). Ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés.

Les polyphénols sont classés en différents groupes (figure 6) en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutants qui les relient (**Manallah, 2012**).

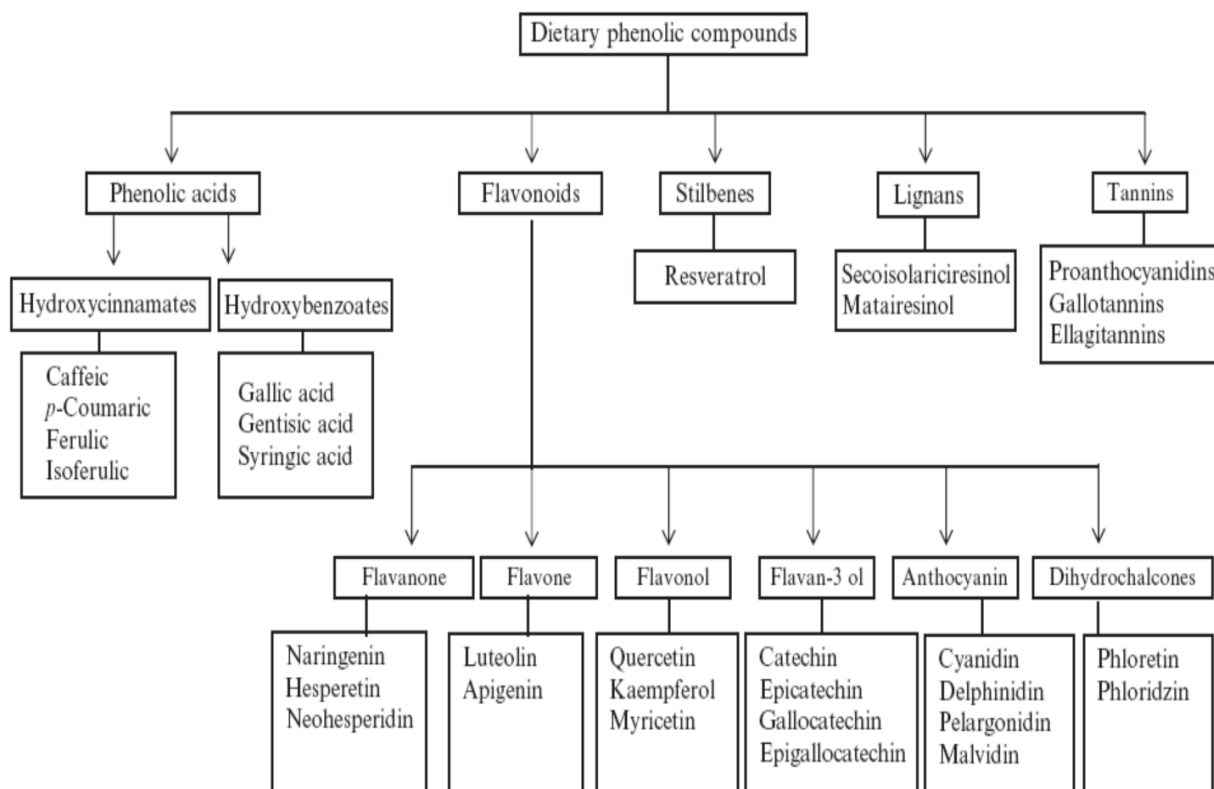


Figure 6: Classification des composés phénoliques (**Vasantha et al., 2014**)

I.10.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des unités simples des composés phénoliques. Ils peuvent être présents à l'état libre, liés entre eux ou attachés aux autres molécules (glucides, protéines, etc.) On distingue deux acides phénoliques; l'acide hydroxybenzoïque et l'acide cinnamique (**Haslam, 1998**).

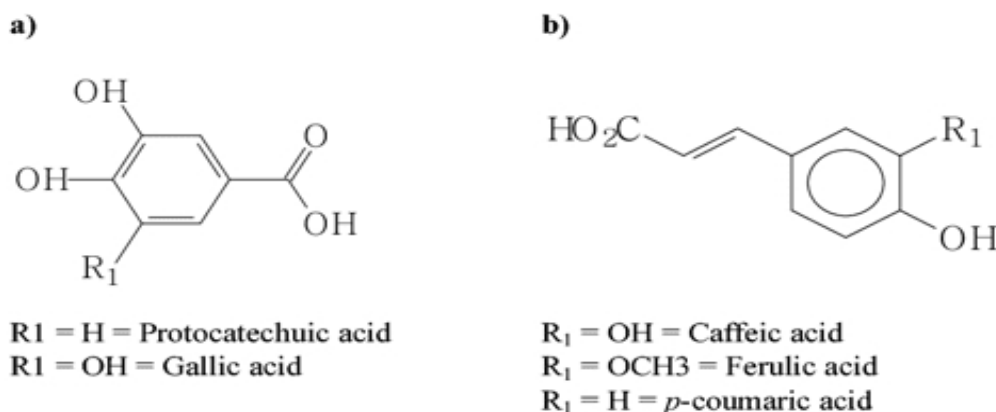


Figure 7: Structures chimiques de l'acide hydroxybenzoïque (a) l'acide cinnamique (b)

(**Rocha et al., 2012**)

I.10.2. Flavonoïde

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits (**Ghestem et al., 2001**). Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glucides. On les trouve, d'une manière générale dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes (**Bruneton, 1993**).

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone (Figure 8) qui est fait de deux cycles phényles C₆, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Ce dernier est situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle centrale). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (**Bruneton, 1999**).

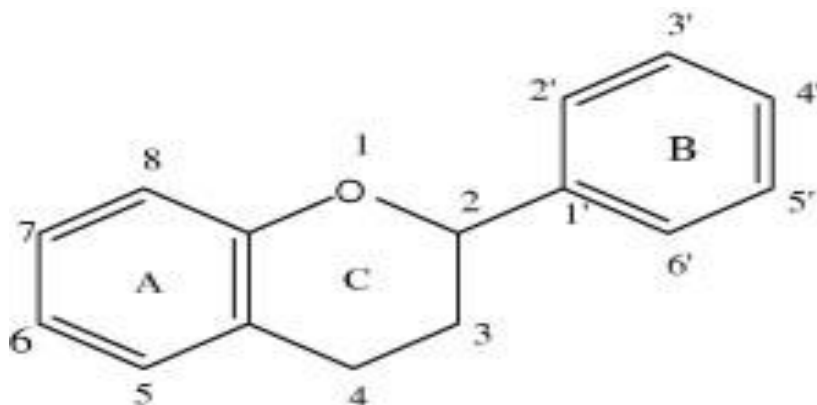


Figure 8: Squelette de base des flavonoïdes (**Xu et al., 2007**)

I.10.3. Les tannins

Les tanins sont des composés polyphénoliques ayant la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre dure et imputrescible en se fixant sur les protéines. La masse moléculaire des tanins peut aller jusqu'à 20 000 daltons (**Haslam, 1989**). Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail. De plus les tanins ayant la propriété de précipiter les protéines réduiraient la valeur Nutritionnelle de certains tissus végétaux. Ils affectent également la digestion des insectes en se liant aux mucoprotéines de leur cavité orale (**Collin et Crouzet, 2011**).

On distingue deux catégories: tanins hydrolysables (Esters de glucose et d'acide gallique) et tanins condensés (polymères constitués d'unités flavane).

I.11. Agents antibactériens

La lutte contre les souches microbiennes est liée à leur pathogénicité et se fait principalement par l'usage d'antibiotiques. L'emploi de ces derniers est assez large et couvre aussi plusieurs domaines. Leur recours a entraîné l'apparition de phénomènes d'antibiorésistance résultant de l'exposition de certaines bactéries et champignons au stress qui peuvent échanger spontanément des gènes de résistance (**Aouni et al., 2013**). Beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits bruts des plantes qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'études pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses (**Yakhlef et al., 2011**).

I.12. Résistance des microorganismes aux antibiotiques

Les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses (**El Amri et Boizot, 2014**).

I.13. Mécanisme d'action des antibiotiques

La connaissance du mode d'action des antibiotiques se révèle extrêmement utile car elle ouvre la voie à la découverte d'autres molécules. Les principaux mécanismes d'action se situent au niveau de la synthèse de la paroi cellulaire, de la réplication de l'ADN, de la transcription, de la synthèse protéique et de la synthèse nucléique de la bactérie. Souvent un antibiotique se comporte comme un analogue de substrat, mais certains peuvent agir au niveau des co-enzymes, parfois par analogie stérique, ou plus souvent en inhibant leur synthèse. Ces composés devraient alors être actifs sur un grand nombre de cellules. La sélectivité de leur pénétration peut expliquer la spécificité de leur action sur certains microorganismes (**Rando, 1975**).

I.14. Les bactéries étudiées

I.14.1. *Staphylococcus aureus*

Est une bactérie Gram-positif (colorée en violet par la coloration de Gram) qui a la forme de cocci et a tendance à être disposée en grappes décrites comme « ressemblant à du raisin ». Sur les milieux, ces organismes peuvent se développer dans un milieu constitué jusqu'à 10 % de sel, et les colonies sont souvent dorées ou jaunes (aureus signifie doré ou jaune). Ces organismes peuvent se développer de manière aérobie ou anaérobie (facultative) et à des

températures comprises entre 18°C et 40°C. Les tests d'identification biochimiques typiques comprennent la catalase positive (toutes les espèces pathogènes de *Staphylococcus*), la coagulase positive (**Rasigade et Vandenesch, 2014 ; Lowy, 1998**)

I.14.2. *Escherichia coli*

C'est une bactérie qui appartient à la famille des entérobactéries. Elles ont comme dimensions moyennes 2 à 3 micromètres de long et 0,6 micromètre de large. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. La majorité des infections urinaires de la jeune femme observée en pratique médicale de ville est due à *Escherichia coli*. Il se développe en 24 H à 37°C sur des milieux gelosés en donnant des colonies rondes lisses à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gelose au sang, elles peuvent être hémolytiques. Sur EMB, on observe souvent des colonies à reflet métallique. Les principaux caractères positifs sont: Indole (+) ONPG (+) Mannitol (+) (**Le Minor et al., 1990**).

I.14.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas est le genre le plus important dans l'ordre des *Pseudomonadales*, ces bactéries sont des bâtonnets droits ou légèrement incurvés. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négative, très répandues dans la nature et caractérisées par leur résistance aux antibiotiques et antiseptiques. *Pseudomonas aeruginosa*, isolé en 1882 par Gessard, est l'espèce la plus connue et la plus répandue du genre *Pseudomonas*, mais aussi la plus pathogène (**Prescott et al., 2010**).

Partie
Experimentale
Chapitre II
Materiel Et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel au laboratoire

Le matériel utilisé au laboratoire « produits et réactifs, appareillage, verrerie» est énuméré en Annexe I

II.1.2. Matériel végétal

La plante ont été nettoyée, séchée à l'obscurité dans un endroit bien aéré, puis broyée et stockée à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.



Figure 9: l'écorce sèche de *P.granatum*

II.1.3. Matériel microbiologique

Les souches bactériennes que nous avons utilisées dans cette partie de notre travail, à savoir le test antibactérien, ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du département de Microbiologie et de Biochimie de l'université de M'sila en Algérie.

Ils sont maintenus par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C. Deux bactéries Gram négative : *Escherichia Coli* ATCC 22922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et une bactérie Gram positive : *Staphylococcus aureus* ATCC 22923.

II.1.4. Les antibiotiques utilisés

Tableau 1: Les antibiotiques utilisés comme témoins positifs

Antibiotique	Nom	Abréviation	Dose
	Streptomycine	S	10µg /disque
	Gentamicine	GEN	10µg/disque
	Colistine sulfate	CS	10µg/disque
	Cefazoline	CZL	30µg/disque

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation de l'extrait de l'écorce de *P. granatum*

La méthode d'extraction que nous avons adoptée pour préparer l'extrait aqueux de l'écorce du fruit de *Punica granatum* selon **Chevallier (2001)**.

10g de poudre d'écorce ont été macérés dans 250ml d'eau distillée à une température de 100°C sous agitation pendant 20 minutes , puis refroidi avant d'être filtré. Le mélange a été filtré à l'aide d'une passoire et puis par papier wattman pour éliminer les débris de la plante. Les résidus secs obtenus ont été récupérés et conservés jusqu'à l'utilisation.

Le rendement en extrait sec exprimé en pourcentage est calculé d'après la formule suivante :

$$\mathbf{R \% = (PES / PE) \times 100}$$

R % : rendement en pourcentage

PES : poids de l'extrait sec (g)

PE : poids de l'échantillon en poudre (g)

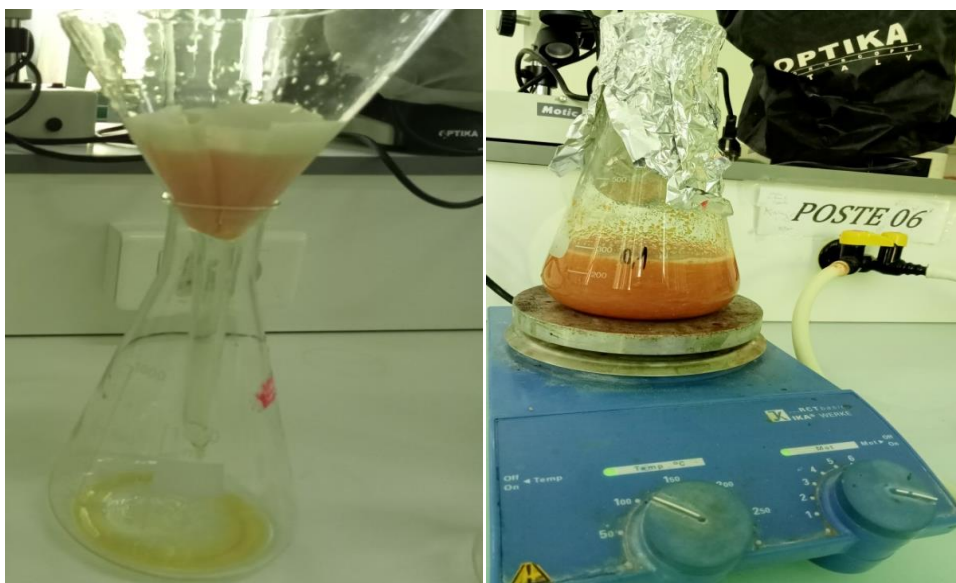


Figure 10: L'extraction et la filtration (Photo réelle)

II.3. Analyses quantitatives

II.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les phénols totaux solubles dans l'extrait aqueux d'écorces de *Punica granatum* ont été déterminés avec le réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode de **Slinkard et Singleton (1977)** avec quelques modifications.

Des aliquotes (0.1 ml) des extraits ont été transférées dans des tubes à essai et leurs volumes complétés à 4.6 ml avec de l'eau distillée. Après l'addition de 0.1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 3 fois), on a ajouté 0.3 ml de solution de Na_2CO_3 à 2%. L'absorbance du mélange a été lue après 2 h à 760 nm. La quantité de composés phénoliques totaux a été exprimée en μg d'acide gallique (EAG) /g de poids sec (PS) du matériel végétal à partir de la courbe d'étalonnage de la solution standard d'acide gallique. Les données ont été présentées comme la moyenne d'analyses en trois exemplaires.

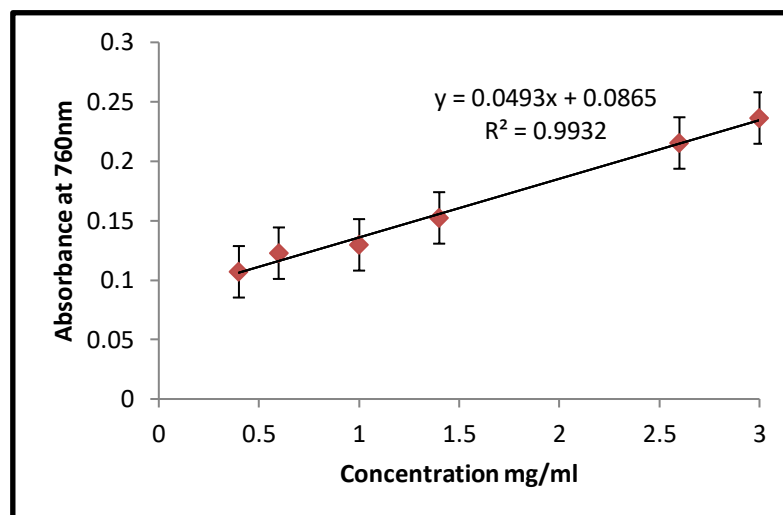


Figure 11: Courbe standard de l'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux.
(Moyenne \pm SD).

II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée à l'aide de la méthode décrite par **Sakanaka *et al.*, (2005)**. En bref, 0.25 ml de l'extrait ou de la solution standard de quercétine ont été mélangés avec 1.25 ml d'eau distillée, suivi par l'addition de 75 μ l d'une solution de nitrite de sodium à 5% (p/v). Après 6 minutes, on a ajouté 150 μ l d'une solution de chlorure d'aluminium à 10% (p/v) et on a laissé reposer le mélange pendant 5 minutes supplémentaires avant d'ajouter 0.5 ml de M NaOH. Le mélange a été complété à 2.5 ml avec de l'eau distillée et bien mélangé. L'absorbance a été mesurée immédiatement à 510 nm. Les résultats moyens de trois répétitions ont été exprimés en mg de quercétine équivalents /g de poids sec (PS).

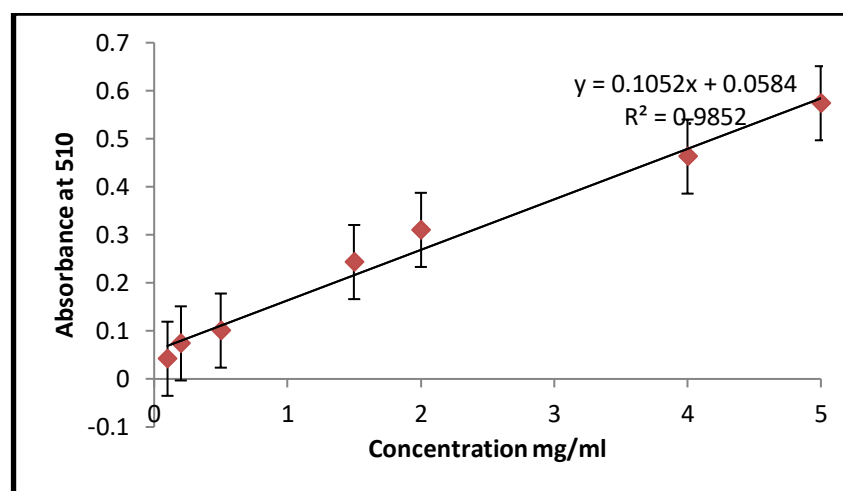


Figure 12: Courbe standard de la quercétine pour la détermination des flavonoïdes totaux (Moyenne \pm SD).

II.3.3. Dosage des tannins

La teneur en tanins a été estimée par la méthode de **Bate-Smith (1973)**. Un volume d'extrait végétal a été dilué pour obtenir une concentration en polyphénols totaux d'environ 500 µg/ml et mélangé avec un volume égal de sang de mouton hémolysé (absorbance égale à 1.6), après 10 minutes cette solution a été centrifugée pendant 20 minutes et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 576 nm. L'efficacité de la précipitation des solutions testées est exprimée en µg d'équivalent acide tannique/g d'extrait.

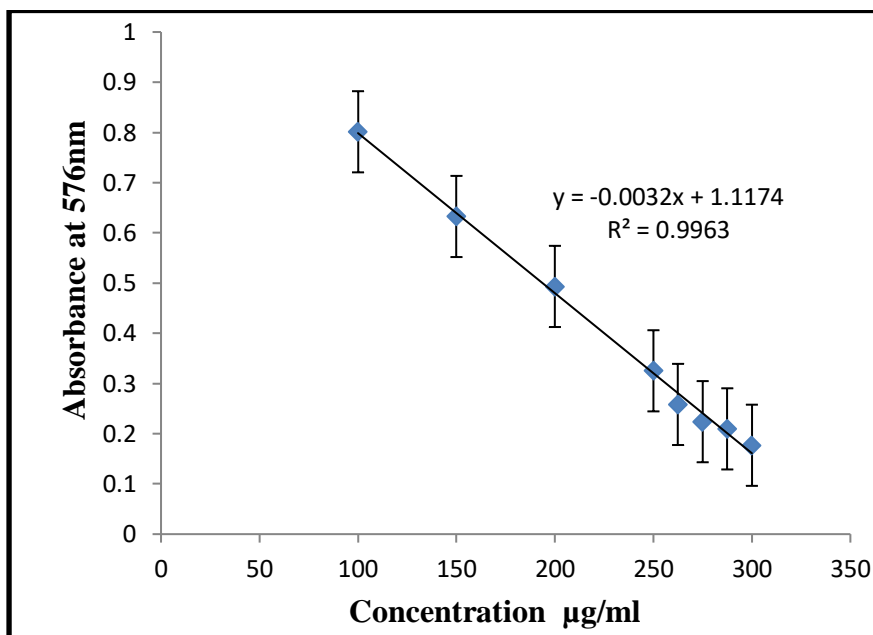


Figure 13: Courbe standard de l'acide tannique pour la détermination des tannins. (Moyenne ± SD).

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante

II.4.1. Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

❖ Principe

La capacité antioxydante de nos extraits qui s'exprime par le don d'un électron ou d'un atome d'hydrogène au radical libre 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), en tant que réactif, a été mesurée par spectrophotométrie (**Burits et al, 2000**).

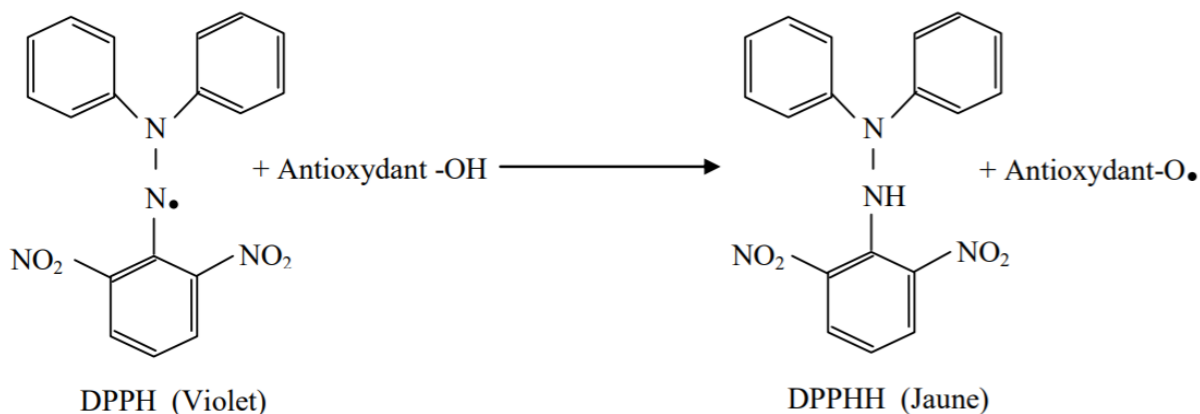


Figure13 : Réaction de DPPH avec les antioxydants (Talbi *et al.*, 2015)

❖ Mode opératoire

L'expérience a été réalisée selon la méthode décrite par **Güllüce *et al.*, (2003)**. 50µl de différentes concentrations des extraits sont ajoutés à 5ml de solution de DPPH de concentration 0,004%. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance est lue avec une longueur d'onde à 517nm. Le contrôle négatif est représenté par la solution méthanolique du DPPH et le contrôle positif est représenté par le BHT.

$$\text{Inhibition \%} = (\text{ABS}_{\text{control}} - \text{ABS}_{\text{test}}) \times 100 / \text{ABS}_{\text{control}}$$

Avec:

ABS Contrôle: Absorbance du contrôle à la longueur d'onde 517nm ;

ABSTest: Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 517nm.

II.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne d'extrait obtenue de *Punica granatum* a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque (**Benslama *et al.*, 2016**). Cette technique est utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antibactérien.

❖ Stérilisation du matériel

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et le bouillon nutritif, les disques en papier wattman, l'eau physiologie, les milieux de cultures ont été stérilisés.

❖ Revivification des souches

Les bactéries à tester, ont été revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures.

❖ Repiquage des souches

A l'aide d'une anse de platine, les souches ont été ensemencées en strie sur des boîtes Petri contenant la gélose nutritive (GN) favorable à leur croissance pendant 24 heures à 37°C.

❖ Standardisation et ensemencement

On prélève à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques de chacune des souches bactériennes à tester et mises dans 9ml d'eau physiologique stérile et après agitation, l'opacité 0.5McFarland ce qui correspond à une densité optique de 0.08-0.13 à une longueur d'onde 620 nm. La concentration finale de l'inoculum est approximativement de l'ordre de 10^7 - 10^8 UFC/ml. L'ensemencement doit se faire en moins de 15min après la préparation de l'inoculum (Khrich *et al.*, 2018).

L'ensemencement des souches testées a été réalisé par écouvillonnage. Les disques imprégnés de nos échantillons ont été déposés délicatement sur la surface de la gélose MHA pré-inoculée à l'aide d'une pince stérile. De même les disques contenant les antibiotiques (Gentamicine, Streptomycine, Colistine sulfate, Cefazoline) comme témoins positifs appropriés et les disques imprégnés d'eau distillée (témoins négatifs) ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des échantillons testés.

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques et peut être symbolisée par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de nos échantillons (Ponce *et al.*, 2003).

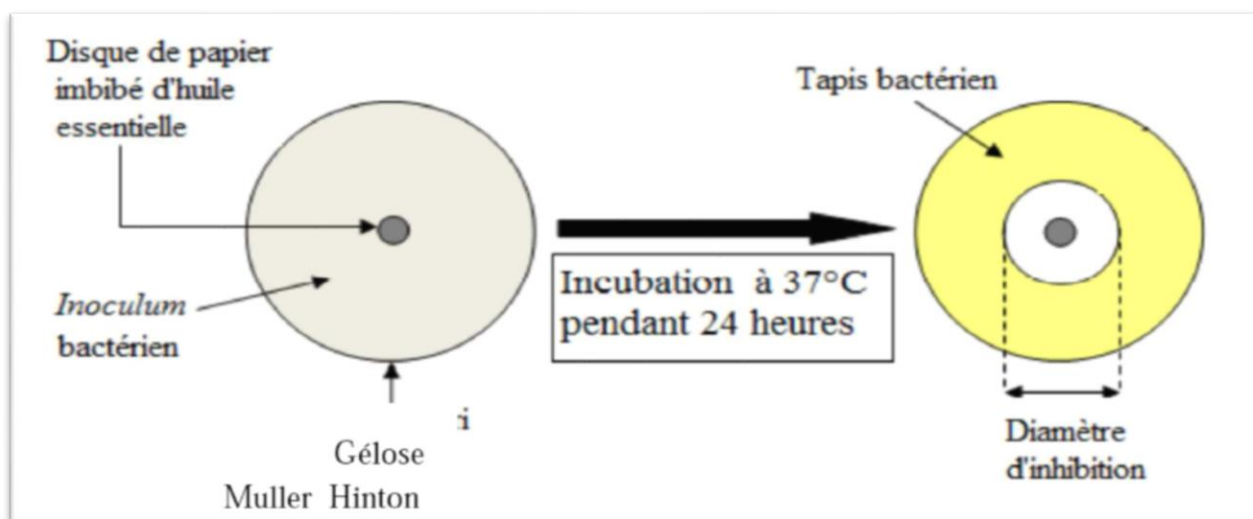


Figure 14: Principe de la méthode de diffusion en milieu gélosé (Ponce *et al.*, 2003).

Tableau 2: Echelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne (Ponce et al., 2003).

Activité antimicrobienne	Degré de sensibilité	Diamètre de la zone d'inhibition
Extrêmement sensible	+++	Plus de 20mm
Très sensible	++	15mm à 19mm
Sensible	+	8 à 14mm
Non sensible	-	Moins de 8mm

II.6. Traitement statistique

Pour chaque test ou méthode, les moyennes et les écarts type des essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2010.

Chapitre III

Résultats Et Discussion

III.1. Rendement de l'extrait de *Punica granatum*

L'extraction se fait par l'eau distillée, cette opération a permis d'obtenir un extrait aqueux. La couleur, l'aspect et le rendement de l'extrait aqueux de l'écorce de *P. grantatum* par rapport au poids de la matière sèche sont représentés dans le tableau 03. Le rendement de cette extraction est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de plante sèche, il est d'une valeur de 23.1%.

Tableau 3: La couleur, l'aspect et le rendement d'extrait de *Punica granatum*.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
EQPG	Pâtecollante	Marron	23.1%

Nos résultats sont supérieurs à ceux d'**Iqbal et al.(2008)** où le rendement est égale à 13.96%, alors qu'il est de 7.53 % dans les resultats de **Singh et al. (2002)**.

Les rendements d'extraction dépendent de plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction, l'origine géographique de la plante (sol et climat), la saison de la récolte, la durée et les conditions de stockage influencent également le rendement d'extraction (**Liu et al., 2015**). La chaleur peut cependant conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (**Cheuib et al., 2018**). Le temps de macération, la température, le choix du solvant (**Tabart et al., 2007 ; Tiwari et al., 2011 ; Terblanche et al., 2017**). L'extraction des composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques (**Mahmoudi et al., 2013**).

III.2. Analyse quantitative

III.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 760nm.

Le tableau 4 présente les résultats de La quantité des polyphénols, a été exprimé en microgramme de poids sec de l'extrait (mg EAG/g Ps).

Tableau 4: Teneur en polyphénols totaux d'extrait de *Punica granatum*

Extrait	[C] des polyphénols (mg EAG/gPS)
EQPG	1034.01±0.10

La teneur en polyphénols totaux de notre étude de l'extrait aqueux d'écorce de *P.granatum* est riche en polyphénols avec un taux de 1034.01±0.10 µg EAG/g Ps. Une autre étude par **Malviya et al. (2014)** à été montrée que la teneur des polyphénols est 438.3±14.5 mgEAG/g Ps, et **Galaz et al. (2017)** qui a été montrée que le rendement d'écorce de grenade frais est d'une valeur de 107.8±13.0 mg EAG/g.

Ces différences trouvées peuvent être attribuées au fait que les phénols sont un groupe hétérogènegruppe de mélange complet de substances organiques, la qualité et la quantité sont variées selon les stades de croissance, conditions écologiques, conditions d'extraction, solutions d'extraction utilisées et d'autres facteurs sur la base desquels les composés phénoliques sont extraits (Jalal et al., 2018).

III.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃). La quercétine a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 510 nm.

Le tableau 5 présente les résultats de La quantité de flavonoïdes, a été exprimé en microgramme de poids sec de l'extrait (µg EQ/mg Ps).

Tableau 5: Teneur en flavonoïdes totaux d'extrait de *Punica granatum*

Extrait	[C] des flavonoïdes (mg EQ/gPS)
EQPG	7.47±0.007

La teneur des flavonoïdes de l'extrait de *P. granatum* est de 7.47±0.007mg EQ/g Ps. Une étude faite par **El Falleh et al. (2012)** montre que la teneur des flavonoïdes totaux de l'extrait aqueux (la rutine a été utilisée comme standard) est de 21.03 ± 1.62mg RE/g Ps et pour l'extrait méthanolique est de 51.52 ± 8.14mg RE/g. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Li et al. (2006)** avec une teneur de 59,1±4,8 mg rutine/g ES. Ces resultats sont differents des notres.

Ces différences peuvent s'expliquer par le facteur variétal ou par la méthode de dosage ou bien par la nature du solvant d'extraction utilisé (**Zhao et al., 2006**).

III.2.3. Dosage des tannins

Le dosage des tannins a été exprimé en microgramme d'équivalent de l'acide tannique par gramme de poids sec de l'extrait ($\mu\text{g EAT/mg Ps}$).

Tableau 6: Teneur en tannins d'extrait de *Punica granatum*

Extrait	[C] des tannins ($\mu\text{g EAT/mgd'extrait}$)
EQPG	442.66±0.015

La teneur des tannins de notre extrait est de $442.66\pm 0.015\mu\text{g EAT /mg d'extrait}$. Ce résultat montre que l'acide tannique induit une précipitation totale de l'hémoglobine.

La quantité des tanins condensés dans l'écorce de la grenade étudiée à celle de **Li et al (2006)** qui citent $10,9\pm 0,5\text{mgEC/g d'extrait sec}$ avec un mélange de méthanol, éthanol, acétone, et eau comme solvant d'extraction.

Cam et Hisil (2010), dans leur étude sur l'extraction des tanins hydrolysables par l'eau, ont rapporté des teneurs assez importantes de l'ordre de $116,6\text{ mg EAT/g d'extrait sec}$. Cela est dû au fait que les tanins soient hydrophiles.

III.3. Activité antioxydante

III.3.1. Test au DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de l'écorce de *Punica granatum* a été évaluée in vitro par la méthode de DPPH. Dans ce test les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en diphenyl picryl-hydrazine, de couleur jaunâtre dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

L'IC₅₀ de BHT et de l'extrait aqueux est déterminée à partir de la partie linéaire de la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration.

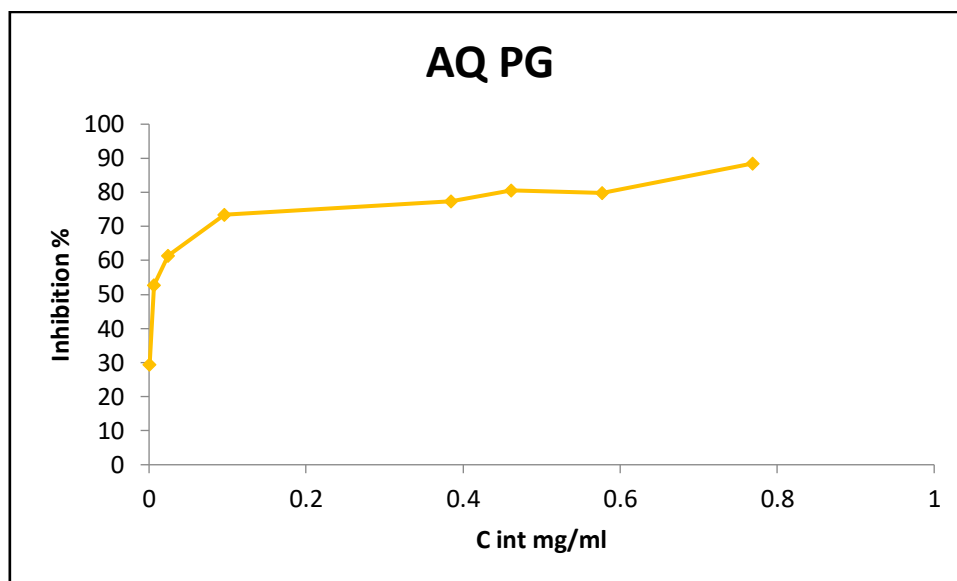


Figure 15: Les pourcentages d'inhibition de DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait aqueux.

Les résultats de l'action antiradicalaire de l'extrait de l'écorce de *Punica granatum* montrent une IC_{50} de l'ordre de $(0.0346 \pm 0.0487 \text{ mg/ml})$. Nos extraits sont plus actifs que le BHT $(0,0318 \pm 0,1282 \text{ mg/ml})$. L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *P.granatum* par le test de DPPH a révélé l'effet actif de l'extrait comme piègeur du radical DPPH.

Tableau 7: Valeurs d' IC_{50} de BHT et de l'extrait aqueux, Les valeurs présentent la moyenne de trois mesures \pm SD.

Extrait	DPPH (IC_{50} mg/ml)
EQPG	0.034 ± 0.04
BHT	$0,031 \pm 0,12$

Dans une autre étude menée par **Zahin et al. (2010)** a donné des pourcentages d'inhibition de l'ordre de : 90.53%, 86.4% et 83.2% pour les fractions de méthanol, d'acétone et d'éthanol, respectivement. Cependant une autre étude de **Malviya et al. (2014)**, l'écorce de grenade présentait une activité antioxydante très puissante, elle se situe entre 94.6% et 79.5% de l'extrait hydro-éthanolique et méthanolique respectivement.

Ces fractions agissent par leur capacité à donner de l'hydrogène, interceptent la chaîne radicalaire d'oxydation en donnant de l'hydrogène à partir du composé phénolique, groupes hydroxyle, formant ainsi un produit final stable qui bloque l'oxydation. En revanche, le pouvoir

réducteur reflète la capacité de donneur d'électrons des composés bioactifs qui est associée à une activité antioxydante (Zahin *et al.*, 2010). Ce pouvoir reducteur de *Punica granatuma* cause de la richesse de cette plante au polyphénols, flavonoids et tannins. Ces composés phénoliques se présentent comme un groupe majeur qui agit comme des antioxydants primaires ou des piègeurs de radicaux libres (kaci-meziane *et al.*, 2017).

III.4. Activité antibactérienne

III.4.1. Test antibactérien

L'activité antibactérienne d'extrait de l'écorce de *Punica granatum* est testée vis-vis de trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia Coli*) par la méthode de diffusion des disques.

La détermination des diamètres de la zone d'inhibition est faite autour des disques contenant l'extrait testés à différentes concentrations : 350, 250 et 150 mg /ml (tableau 8).

Tableau 8: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance des trois bactéries.

Les souches	[C]Diamètres des zones d'inhibiti d'extrait (mg /ml)		
	350(mg /ml)	250(mg/ml)	150(mg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	8	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	17	15
<i>Escherichia Coli</i>	11	0	0

La sensibilité de l'extrait à une concentration de 350 mg/ml sur les trois souches bactériennes (*P. aeruginosa* *S. aureus* et *E. Coli*) démontre un diamètre de 10, 20 et 11mm respectivement. A une concentration de 250mg/ml, on remarque une résistance de la bactérie *E. Coli* et une sensibilité contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* à un diamètre de 8,17mm respectivement.

Nos résultats montrent que l'extrait est actif sur les trois souches étudiées à *Staphylococcus aureus* avec un diamètre variant entre (20 à 15 mm). Cette souche est la plus susceptible par

comparaison avec les bactéries Gram- (*Pseudomonas aeruginosa* 10 à 7 mm) et *Escherichia Coli* de diamètre 11mm (figure 16).

Le test antibactérien de l'extrait s'est montré actif sur les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *E.coli*. Les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration en extrait.

Ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-. Ces résultats confirment que l'écorce de la plante *Punica grantatum* est douée de propriétés antibactériennes (Lairini et al., 2014).

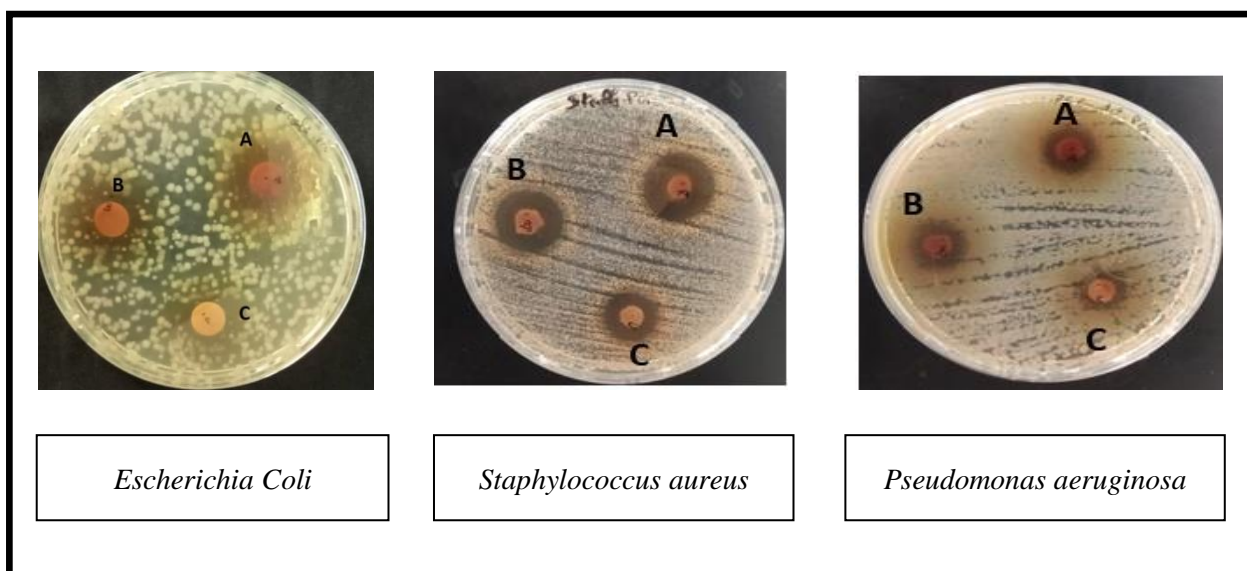


Figure 16: les zones d'inhibition de la croissance bactérienne (A:350 mg/ml, B:250mg/ml, C: 150mg/ml).

Malviya et al. (2014), ont étudié l'activité antibactérienne de trois extraits (méthanolique, éthanolique, aqueux) de l'écorce de *P.granatum*. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que cet extrait possède un effet inhibiteur sur *Staphylococcus aureus* (24.5, 20.3 et 22.6 mm) respectivement.

Ces résultats corroborent ceux de Lairini et al. (2014) qui ont montré que l'extrait de l'écorce de grenade présente une activité antimicrobienne significative contre *E.coli* et *S.aureus*. L'effet inhibiteur des ces germes commence à partir de 0.12mg/ml d'extrait pour *S.aureus* avec un diamètre de 9.03 ± 0.15 mm et de 0,31 mg/ml pour *E.coli* avec un diamètre de 10.04 ± 0.3 mm.

D'autres études confirment l'effet inhibiteur de l'adhérence des microorganismes par *Punica granatum*, qui est due à la présence des polyphénols et des tannins (Haslam, 1996).

L'action inhibitrice est notée chez les bactéries Gram + que les bactéries Gram -. Les différences de sensibilité des bactéries Gram négatives et des bactéries Gram positives indiquées

par la présence de substances antimicrobiennes considérées comme liées à la structure et à la composition de leurs parois cellulaires. En effet les bactéries Gram positive ont une couche externe plus perméable riche en peptidoglycanes alors que les bactéries Gram négative ont une barrière externe plus rigide en phospholipides. L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux divers agents chimiques présents dans ces extraits, y compris les flavonoïdes et les tanins ainsi que d'autres composés phénoliques libres ou groupes hydroxyle qui sont classés comme composés antibiotiques hautement actifs (**Reguieg et Hammadi, 2017**).

Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. IL a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (**Scalbert, 1991**).

III.4.2. L'antibiogramme

La technique consiste à ensemencer un germe pathogène sur le milieu de Miller Hinton et l'amener au contact de la substance à tester par la méthode de diffusion sur disque. 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 (Tableau 9). Il s'agit de Gentamicine, Streptomycine, Colistine sulfate et Cefazoline.

Tableau 9: Diamètres des zones d'inhibition d'antibiogramme des trois souches utilisées.

Les souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
	Les antibiotiques				
	Contrôle négatif (eau distillée)	Gentamicine (GEN)	Streptomycine (S)	Colistine sulfate (CS)	Cefazoline (CZL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	31	21	12	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	34	24	0	0
<i>Escherichia Coli</i>	0	30	23	11	0

- ✓ La sensibilité des trois souches à la Gentamicine avec des diamètres des zones d'inhibition entre 30 et 34mm.
- ✓ La résistance des bactéries étudiées à la cefazoline, et *S.aureus* vis-à-vis de la Colistine sulfate.

Les résultats du test d'antibiogramme (antibiotiques), ont montré une efficacité remarquable contre les souches bactériennes étudiées, avec des zones d'inhibitions variant entre 11et 34mm de diamètre (Figure 17).

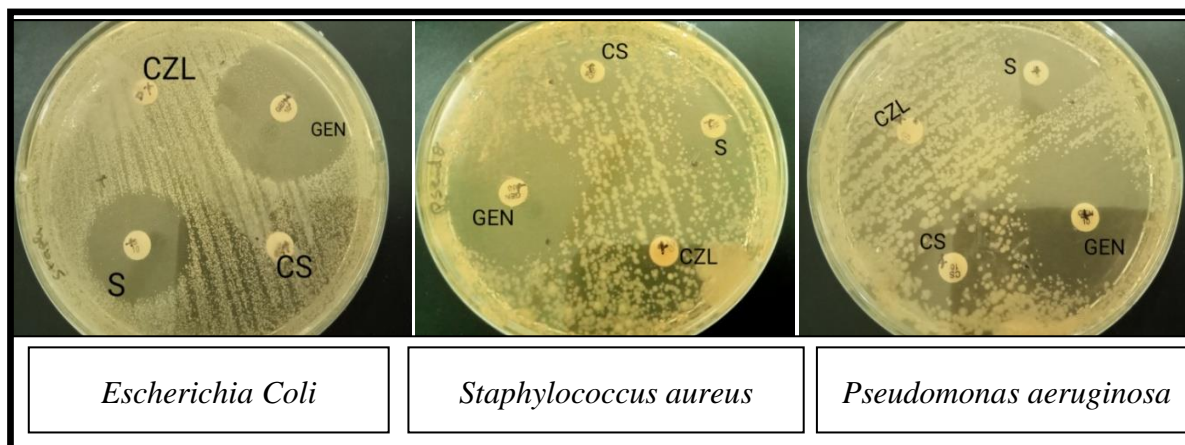


Figure 17: L'antibiogramme des trois souches utilisées

Conclusion

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. Dans le présent travail, différents aspects de *Punica granatum* ont été étudiés: propriétés phytochimiques, activités antioxydantes et antibactériennes des extraits aqueux.

L'extraction par décoction de l'écorce de la plante a permis d'obtenir un rendement de la valeur de 23.1%, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes et tannins étaient comme suit : 1034.01 ± 0.10 μg EAG/ g Ps ; 7.47 ± 0.007 μg EQ/mg Ps, 442.66 ± 0.015 μg EAT /mgd'extrait respectivement.

L'activité antioxydante d'extrait de *Punica granatum* a été évaluée par méthode DPPH, ce qui montre un $\text{IC}_{50} = 0.034 \pm 0.048$ mg/ml. Nos extraits sont plus actifs que le BHT.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur trois souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disques. Le test antibactérien de l'extrait s'est montré actif sur les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition 15, 17 et 20mm), *E.coli* (11mm), et (7, 8,10mm) pour *Pseudomonas aeruginosa*. Les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration en extrait.

Ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-. Les résultats indiquent que l'extrait aqueux possède une activité antibactérienne sur toutes les souches testées grâce à la présence des polyphénols, flavonoïdes, et des tannins.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement actives. Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne de l'extrait de cette plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Ashok K.(2012).international journal of pharmaceutical and chemical sciences

Afaq, F., Malik, A., Syed, D. (2005). PhotochemPhotobiol, 818-45.

Aouni, M., Pelen, F., Soulimani, R. (2013). Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. Phytothérapie, 11(4), 225-236.

Amini, R. (2010). Analyse chimique et activité bactérienne de trois plantes médicinales antituberculeuses à Kisangani ; Monographie, inédite. faculté des sciences, UNIKIS.

Ayala-Zavala, JF., Wang, SY., Wang ,CY y., González-Aguilar ,GA. Eur. (2005) Food Res Tech 221 : 731-738.

Ayensu SE. (1981). Medicinal plants of West Indies. Algonac, MI: Reference Publications.

Bate-Smith E C. (1973). Haemanalysis of tannins, the concept of relative astringency. Phytochemistry, 12:907-912.

Bendif H. (2017). Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques lamiaceaeajugaivaschreb, teucriumpolium thymus munbyanusubsp. Coloratus (hoiss. &reat) greater&burdet et rosmarinuscriocalyxjord& four. These de doctorat, Ecole normale supérieure de kouba-Alger, 154 p.Belakhdar, 1997.

Benslama, A., Harrar, A., Gül, F., Demirtaş, I. (2019).In vitro antioxidant, antibacterial activities and HPLC-TOF/MS analysis of Anvillearadiata (Asteraceae) extracts. Current Nutrition & Food Science 15(4): 376-383.

Bianchini F, Corbetta F. (1979). Health plants of the world. New York: Newsweek.

Boizot, N., & Charpentier, J.-P.(2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des Techniques de l'INRA, 79–82.

Boulos L. (1983) .Medicinal plants of NorthAfrica. Algonac, MI: Reference Publications.

Braga, L.C ., Leite , A.A.,Xavier,K.G., Jakahashi,J.A.,Bemguerrer,P .P., Chartone-Souza,E., and Nascimento,A.M. (2005). Candian Journal of Microbiology 51 : 541-547.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, Paris.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed.

Ed. Médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.

Burits M and Bucar F. (2000). Antioxidant activity of Nigellasativa essential oil. *Phytotherapy research*. 14, 323-328.

Cam M. et Hisil Y.(2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, In Press, Corrected Proof.

Cheaib D, El Dara N, Rajha H.N, El-Ghazzawi I, Maroun R.G, Louk N. (2018). Effect of the Extraction Process on the Biological Activity of Lyophilized Apricot Extracts Recovered from Apricot Pomace. *Antioxidants*, 7(11), 1-10.

Chevallier A.(2001) *Encyclopédie des plantes médicinales* . Larousse. PP: 61,293.

Collin, S., etCrouzet, J.(2011). *Polyphénols et procédés*. Edition Lavoisier TEC & DOC, p 5-13- 16-235.

Cowan, mm.(1999). Plant product as antimicrobial agents. *ClinicalMicrobiologyReviews*, vol. 12, no. 4, p. 564-582.

Di Silvestro, RA., Di Silvestro, DJ y., Di Silvestro, DJ. (2009). *PhytotherRes* 23 1123–1127.

Duke AJ, Ayensu SE. (1985). *Medicinal plants of China*. Algonac, MI: Reference Publications . Ed. Médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.

Eisenberg, D. M., Davis, R. B., Ettner, S. L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M.,&

El amri , J. Appl. Biosci.(2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucriumcapitatum* L et l'extrait de *Siléne vulgaris* sur différentes souches testées.

Elfalleh W., Hannachi H., Tlili N., Yahia Y., Nasri N. Et Ferchichi A. (2012). Total phenolic contents and antioxidantactivities of pomegranatepeel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(xx), 4724-4730.

Fournier, P. (1948). Editeur Paul Lechevalier. Tome II. 504 : 286 - 291.

Garnier ,G., Bezanger-Beauquesne, L., Debraux, G.(1961) .Ed Vigot Frères.Tome II. .1511.

Ghestem A., Segun E., Paris M., Orecchioni A-M. (2001).*Le préparateur en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie*. Lavoisier Tec et Doc, Paris ,273p.

Goudable J. & Favier A.(1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11, 115-120.

Grunwald J. Janick C. 2006. *guide de la phytothérapie*. 2ème édition. Italie: marabout.

Güllüce M, Sokmen M, Daferera D, Agar G, Ozkan H, Kartal N, Polissiou M, Sokmen A and Gupta V, Mittal P, Bansal P, Khokra SL and Kaushik D., 2010. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. International journal of pharmacology science of drug research. 2, 12-6.

Haslam E. (1989). Plant polyphenols - Vegetal tannins revisited: Cambridge University Press (Bio Essays volume 12).UK., p: 230.

Haslam E. (1996). Natural polyphenols (vegetables tannins) as drugs: possible modes of action. J Nat Prod, 59:205-215.

J. Haleng, J. Pincemail , J.O. Defraigne , C. Charlier , J.P. Chapelle .(2007).le stress oxydant,62:10:628-638.

Jacques Dommes. (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. Food Chemistry 105,1268–1275

Jafri, MA., Aslam, M., Javed, K., Singh, S. Journal of ethnopharmacology. 70. (2000) 309-314.

Jalal, H., Pal, M,A., Hamdani, H., Khan ,N,N.(2018)Antioxidant activity of pomegranate peel and seed powder extracts.Journal of pharmacogn.Phytochem,7(5):992-997.

Jessica Tabart, Claire Kevers, Arnaud Sipel, Joel Pincemail, Jean-Olivier Defraigne, Kaci-Meziane Zoubida, Boutekrabt Linda, Laidoudi Djamila, Moussaoui Tarek Melahi Kessler,R. C. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: Results of a follow-up national survey. Jama, 280(18), 1569–1575.

Nawel, Ait Ouarab Dahbia, Djeghboub Meryam, Meguetaoui Asma.(2017). Evaluation phytochimique, et potentiel antioxydant , antibactérien de trois cultivars de fruit de grenadier "*punicagranatum* l" du nord est d'algerie: Revue Agrobiologia, 7(2): 589-602.

Kahlouche R F. (2014). Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie. These de doctorat, université de Constantine, 128p .

Lansky E. et Newman R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of Ethnopharmacology.109: 177–206pp.

Le minor I., sansonetti p.h., richard ci. (1990). Entérobactéries. In bactériologie médicale. 2ème édition. Paris:flammarion,,: 389p. 22.

- Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J. et Cheng S.** (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate peel extract. *Food Chemistry*, 96: 254–260.
- Lugasi, A.** (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*, 47(1–4), 119–125.
- MahmoudiSouhila ,Khali Mustapha Et MahmoudiNacéra.** (2013) Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09.
- Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, VM., Syed, DN., Mukhtar, H.**(2005) *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 14813–1418.
- Manallah, A.** (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea L*, Pour obtenir le Diplôme de magister. 87p.
- Navarro, P., Nicolas, TS., Gabaldon, JA., Mercader-Ros, MT., Calín-Sánchez, Á., Carbonell-Barrachina, ÁA y., Pérez-López, AJ.**(2011). *Food Sci* 76(5) 319-32.
- Nogaret, A.-S.** (2011). La phytothérapie : Se soigner par les plantes. Editions Eyrolles.
- Perscott et Harly, Klein, Wiley, Sherwood, Woolverton.**(2003). *Microbiologie*, de boeck, 3^eème Pédition, Bruxelles , 233 : 1075.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.-O.**(2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233–239.
- Ponce, G., Fritz, R., Del Valle, E., Roura, I.** (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie*, (36) : 679–684p.
- Rando.** (1975). Mechanisms of action of naturally occurring irreversible enzyme inhibitors. *Acc. Chem. Res.* 8 / 281-288 .
- Reddy, M. K.** (2018). Phenolic Compounds in Pomegranate (*Punicagranatum L.*) and Potential Health Benefits. *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health*, 201–223. doi:10.1021/bk-2018-1286.ch011.
- ReguiegYssaad A Et Hammadi K.** (2017). In Vitro Antimicrobial Activity of Phenolic Extracts of the Pomegranate (*Punica granatum*). *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4 (6), 100-107.

- Rocha, LD, Monteiro, MC et Teodoro, AJ.** (2012). Propriétés anticancéreuses des acides hydroxycinnamiques - Une revue. *Cancer et oncologie clinique*, 1(2).
- S. Lairini , R. Bouslamti , F. Zerrouq et A. Farah.**(2014).Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punicagranatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante. *J. Mater. Environ. Sci*,5(S1), 2314-2318.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., &Okada, Y.**(2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89, 569–575.
- Sathyavati GV, Gupta AK, Neeraj T.** (1987). *Medicinal plants of India*. New Delhi. 2. Indian Council for MedicinalResearch;p. 540.
- Scalbert A** (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- Schauenberg, P., & Paris, F.**(1977). *Guide to medicinal plants*. Guildford, LutterworthPress (p. 349).
- Singh, R. P., Chidambaramurthy, K. N., &Jayaprakasha, G. K.**(2002).Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punicag ranatum*) Peel and SeedExtractsUsing in Vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81–86.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L.**(1977). Total phenolanalysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Tabart J, Kevers C, Sipel A, Pincemail J, Defraigne J.O, Dommes J.** (2007). Optimisation of
- Talbi H., Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J., Hilali A.,**(2015). Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigellasativa* L. *Mater. Environ. Sci.* 6 (4): 1111-1117.
- Terblanche U, Semakalu CC, Mtunzi F, Pillay M.** (2017). Screening of Variables Influencing Extraction Yield of *Cotyledonorbiculata*: 2 3 Full Factorial Design. *J PharmacognPhytochemRes*, 9(3), 303-312.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H.** (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci*,1 (1),98–106.
- VasanthaRupasinghe, HP, Nair, SVG et Robinson, RA** .(2014). Propriétés chimiopréventives des composés phénoliques de fruits et leur mode d'action possible. *Études en chimie des produits naturels*, 229–266.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D.** (1998). Antioxidantactivity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113–17.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E. y Pérez-Álvarez JA. (2011). *Food Res Int* 44: 1217-1223.

Wichtl M., Anton R. (2003). *Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*, 2ème édition, Ed. TEC & DOC.

Xu, YC, Leung, SWS, Yeung, DKY, Hu, LH, Chen, GH, Che, CM et Man, RYK. (2007). Relations structure-activité des flavonoïdes pour la relaxation vasculaire dans l'artère coronaire porcine. *Phytochimie*, 68:1179–1188.

Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurusnobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9(4), 209-218.

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.

Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L., Lin Y., Fan W., Gu. (2006). Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and Selectivity for free phenolic compounds in barley *Hordeum vulgare* L. *J. Agric. Food Chemistry* 54: 7277–7286.

Annexes

Produits de travail:

Produit	Formule brute
Méthanol	CH_3OH
Quercetine	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$
DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	/
L'eau distillée	/
Chlorure d'aluminium	AlCl_3
Carbonate de sodium	Na_2CO_3
Réactif de Folin-Ciocalteu	/
Acide gallique	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$
Hydroxyde de sodium	NaOH
Sodium nitrate	NaNO_3
Mueller-Hinton (MH)	/

Matériels utilisés:**Appareillage**

Étuve

Balance de précision

Spectrophotomètre

Incubateur

Vortex

Autoclave

Centrifugeuse

Agitateur magnétique

Verrerie : béchers, éprouvettes graduées, tube à essais, micropipette, pipette Pasteur, boîte pétri,

boîte en verre, erlenmeyer, entonnoir
