



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE

LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR – KHENCHELA –

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

FILIERE : Sciences Biologiques

OPTION : Biochimie Appliquée

Thème

**Caractérisation des activités biologiques de
plusieurs extraits de la plante**

« Punica granatum L. »

Présenté par :

LAKHNECHE Ahlem

RAHAL Hana

SEKKIOU Kawther

Membres de jury :

Présidente : Mme. KRIM Meriem (M.C.B) Université Abbes Laghrou-Khenchela
Promoteur : Mr. MAAMAR Hichem (M.C.B) Université Abbes Laghrou-Khenchela
Examinatrice : Mme. MALLEL Hanan (M.C.B) Université Abbes Laghrou-Khenchela

Année universitaire : 2022- 2023



Remerciements

*Notre première gratitude va au tout-puissant **ALLAH** الله, le créateur de tout, pour nous avoir données la vie, le bénédicité et la force pour accomplir ce travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mr MAAMAR Hichem** pour avoir accepté de nous encadrer, ainsi que pour sa présence et son aide tout au long de ce modeste travail, ses bons conseils et sa formidable contribution.*

*Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements aux membres du jury, **Mme krim Meriem** et **Mme Malel Hanan** maîtres de conférences à l'Université Abbas Laghour - Khenchela. Nous les remercions pour l'honneur d'avoir accepté et participé à ce jury.*

Nous remercions également les responsables des laboratoires pédagogiques de biologie de l'Université Abbas Laghour -El Hamma, pour leur gentillesse et leur aide à prendre les mesures et à nous fournir les informations nécessaires pour mener à bien nos expériences de laboratoire.

Nous tenons à remercier profondément tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à nos enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie et à tous les étudiants de Master 2 Biochimie appliquée.

Et enfin, un grand merci à nos familles, sans qui ce travail n'aurait pas été accompli.



Dédicace

Au nom d'Allah, que la prière et les alu soient sur le messager d'Allah, je dédie ce travail :

*À mes chers parents Mon cher père **Abd Allah**, le réconfort de mes yeux et de mon cœur, qui m'a encouragé pour aller de l'avant et qui a consacré sa vie et ses efforts pour le bien de mon éducation et m'a amené au plus haut niveau, sans lequel je n'aurais pas atteint ce jour. Que Dieu le protège et le garde.*

*À ma chère mère **Warda**, la bougie de ma vie, la source de force et de tendresse. À celle qui m'a gardé à l'aise, m'a élevée, m'a appris les principes de la vie, et m'a toujours encouragée à étudier et à construire mon avenir, qui ne cesse de prier pour moi. Que Dieu la protège et prenne soin d'elle.*

*À ma chère seule sœur **Lamyia**, sans qui la vie n'aurait aucun goût, la source de mon bonheur et mon soutien dans toutes mes opinions et décisions. Que Dieu la protège et prenne soin d'elle.*

*À mes chers frères : mon grand frère **Houssin, Abd Malek, Youcef, Messoud**.
Que Dieu les protège et prenne soin d'eux.*

*À Mon chère amie **Ismhen**, mes binômes **Ahlem, Hana**.*

À toute ma famille, mes collègues et tous ceux qui m'ont soutenue pendant cette période.

Kawthar



Dédicace

À l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie, ma mère, qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

À mon cher père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.

*À mes précieuses sœurs **Amira** et **Karima**, mes mots ne pourront jamais résumer ma reconnaissance et mon amour. Ma chérie **Amira**, je te remercie avec tous mes sentiments pour ton soutien, je te souhaite la réussite pour ton bac.*

*À mes chers frères : **Abd El Halim, Fouad, Hicham, Abd El Basset, Khalil**, que dieu les protège et prenne soin d'eux.*

*À ma chère belle-sœur **Salma**.*

*À mes chers neveux : **Aseel, Anas, Esraa**.*

*À ma meilleure amie **Imane**, à ma sœur que la vie l'offre.*

*À mes fidèles amies : **Kawthar, Hana, Qamer, Wissam, Samah, Fairouz**.*

À toute ma famille, proche ou éloignée.

Ahlem



Dédicace

*Avec l'aide de Dieu Tout-Puissant, qui a tracé le chemin de ma vie, Je dédie ce
modeste travail à :*

*Mes parents, grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils
ont pu créer un climat affectueux et propice à la poursuite de mes études. À la
source de la tendresse qui ne se concentre pas sur ma chère mère, que Dieu la
protège et prolonge sa vie, c'est à vous que je dédie le fruit de mon effort.*

*À celui qui m'a appris et m'a donné une personnalité unique et ne m'a pas lésiné
de ses conseils et de ses conseils A mon père, que Dieu le protège et prolonge sa
vie À mes frères et sœurs en particulier ma très chère sœur, **Siham** qui a
toujours été un exemple pour moi et qui s'est toujours comportée comme une
deuxième maman. À ma chère sœur, **Fatama** les mots ne peuvent résumer ma
reconnaissance et mon amour. A mes chers frères **Khaled** et **Kamal**, et à mon
soutien et compagnon, mon cher frère **Zakaria**, que je remercie pour son soutien
et ses encouragements tout au long de mon parcours universitaire.*

*À ma grand-mère bien-aimée, que Dieu ait pitié de son âme et fasse de son lieu de
repos au paradis.*

*Mon encadreur **dr MAAMAR Hichem**, c'est tous ses remerciements au
dr BADIS Zakaria c'est tous ses remerciements. Toute mes amies et mes
collègues, **Zainab**, **Maha**, **Kawthar**, **Ahlam**, **Rima** et **Jawhara**. Tous mes
enseignants de département BMC.*

Hana

Résumé

Punica granatum est une plante appartenant à la famille des *Lauracée*, elle est considérée comme l'une des plantes les plus anciennes et les plus célèbres depuis l'Antiquité. Cette étude vise à comparer l'extrait méthanolique (EMPG), l'extrait éthanolique (EEPG) et l'extrait butanolique (EBPG) de l'écorce du fruit de *Punica granatum L.* Les tests phytochimiques ont montré la présence de flavonoïdes, de tanins, de quinones libres, de saponines, de terpénoïdes, et des composés réducteurs dans tous les extraits. Les analyses qualitatives par chromatographie (CCM) ont révélé la présence des différentes classes flavonoïques. Les examens quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteau et des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 ont révélé que les concentrations les plus élevées de polyphénols et de flavonoïdes ont été trouvées dans l'extrait éthanolique ($52,469 \pm 3,191 \mu\text{g}/\text{mg EAG}$) et dans l'extrait méthanolique avec une valeur de ($32,729 \pm 0,342 \mu\text{g EQ}/\text{mg}$), respectivement. Les résultats de l'activité antioxydante effectuée en utilisant la méthode de réduction des radicaux DDPH, ont indiqué la supériorité de l'extrait EMPG avec le pourcentage le plus élevé de $92,46 \pm 0,43$. Dans l'activité antibactérienne, l'écorce de *Punica granatum L.* a montré une activité remarquable sur quatre souches bactériennes étudiées, qui sont *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumonia*.

En conclusion, l'écorce de *Punica granatum L.* est doué d'une activité antioxydante et antibactérienne remarquables. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle afin d'atténuer les complications du stress oxydant associé ou déclenchant d'autres maladies et une bonne alternative aux antibiotiques contre les infections bactériennes.

Mots-clés : *Punica granatum*, activité antibactérienne, activité antioxydante, CCM, polyphénols, flavonoïdes.

Abstract

Punica granatum is a plant belonging to the *Lythraceae* family ; it is considered one of the oldest and most famous plants since ancient times. This study aims to compare the methanolic extract (EMPG), the ethanolic extract (EEPG) and the butanolic extract (EBPG) of the peel of the fruit of *Punica granatum* L. Phytochemical tests showed the presence of flavonoids, tannins, free quinones, saponins, terpenoids and reducing compounds in all extracts. Thus, the qualitative study by TLC of the extracts revealed a remarkable diversity of flavonoid. Quantitative examinations of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and flavonoids by the $AlCl_3$ method revealed that the highest concentrations of polyphenols and flavonoids were found in the EEPG extract ($52,469 \pm 3,191 \mu\text{g}/\text{mg}$ EAG) and in the EMPG extract with a value of ($32,729 \pm 0,342 \mu\text{g}$ EQ/mg), respectively. The results of the antioxidant activity performed using the DDPH radical reduction method, indicated the superiority of the EMPG extract with the highest percentage of $92,46 \pm 0,43$. In antibacterial activity, bark of *Punica granatum* L. showed remarkable activity on four studied bacterial strains, which are *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*.

In conclusion, bark of *Punica granatum* L. has a remarkable antioxidant and antibacterial activity. Therefore, it can be a natural resource to alleviate the complications of oxidative stress associated or triggering other diseases and a good alternative to antibiotics against bacterial infections.

Keywords: *Punica granatum*, antibacterial activity, antioxidant activity, polyphenols, CCM, flavonoids.

ملخص

Punica granatum هو نبات ينتمي إلى عائلة *Lythraceae*، ويعتبر من أقدم وأشهر النباتات منذ العصور القديمة. تهدف هذه الدراسة إلى مقارنة المستخلص الميثانولي (EMPG) والمستخلص الإيثانولي (EEPG) ومستخلص البوتانول (EBPG) من لحاء ثمار *Punica granatum L*. أظهرت الاختبارات الكيميائية النباتية وجود مركبات الفلافونويد والعفص والكينون الحر والصابونين والتربينويدات والمركبات المختزلة في جميع المستخلصات. في حين كشفت الدراسة النوعية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) عن وجود فئات مختلفة من الفلافونويد. كشفت الفحوصات الكمية لمجموع البوليفينول بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu والفلافونيدات بواسطة طريقة $AlCl_3$ أن أعلى التراكيز من البوليفينول والفلافونويد تم العثور عليها في مستخلص EEPG (3.191 ± 52.469 ميكروغرام / مجم EAG) وفي مستخلص EMPG بقيمة قدرها (0.342 ± 32.729 ميكروغرام EQ / mg)، على التوالي. أظهرت نتائج النشاط المضاد للأوكسدة الذي تم إجراؤه باستخدام طريقة الاختزال الجذري DDPH تفوق مستخلص EMPG بأعلى نسبة 0.43 ± 92.46 . في النشاط المضاد للبكتيريا، أظهر لحاء *Punica granatum L* فعالية ملحوظة في أربع سلالات بكتيرية مدروسة وهي *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumonia*.

وفي الأخير نستنتج أن قشور الرمان لديها نشاط ملحوظ مضاد للأوكسدة ومضاد للبكتيريا وهذا ما يجعلها مصدرا طبيعيا للتخفيف من مضاعفات النشاط التأكسدي الذي يسبب امراض اخرى وبديل للمضادات الحيوية ضد الالتهابات البكتيرية.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum* ، نشاط مضاد للبكتيريا ، نشاط مضاد للأوكسدة ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، بوليفينول ، مركبات الفلافونويد.

Table des matières

Résumé

Liste des figures

Liste des Tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Etude bibliographique

Chapitre I : Les plantes médicinales et le grenadier

I. Plante médicinale et phytothérapie	3
I.1. Définition d'une plante médicinale	3
I.2. Modes d'utilisation des plantes médicinales	3
I.3. Avantages des plantes médicinales par rapport aux drogues de synthèse.....	4
I.4. La phytothérapie.....	4
I.4.1. Les avantages de La phytothérapie	4
I.4.2. Les inconvénients de La phytothérapie.....	5
I.5. Les principaux actifs des plantes.....	6
I.5.1. Définition	7
I.5.2. Les principaux éléments actifs des plantes	7
II. Le grenadier : <i>Punica granatum L.</i>	7
II.1. Classification botanique.....	10
II.2. Composition chimique des différents organes du grenadier.....	11
II.2.1. L'écorce de la racine.....	12
II.2.2. Les feuilles.....	12
II.2. 3. Les fleurs.....	12
II.2.4. Les fruits	13
II.2.5. Ecorce (Membranes blanches et la partie comestible).....	14

II.3. Origine et répartition géographique	15
II.4. La culture du grenadier	15
II.5. Le grenadier en Algérie	15
III. La grenade	15
III.1. La situation économique de la grenade	16
III.2. Les variétés de grenade.....	16
III.3. Utilisation de grenade.....	16

Chapitre II : Les activités biologiques

I. Généralités.....	18
II. Activité antioxydante	18
III. Activité antibactérienne	20
IV. Activité anti-inflammatoire	20
V. Activité antidiabétique.....	21
VI. Activité anti-cancéreuses et anti- tumorale	21
VII. Activité antiviral et anti-COVID-19	22
VIII. Prévention des Maladies Cardiovasculaires	22
IX. Autres propriétés de grenade	22

Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I. Matériel	24
I.1. Matériel biologique	24
I.1.1. Matériel végétal.....	24
I.1.2. Souches bactériennes.....	25
I.1.3. Réactifs chimiques et équipements	26
II. Méthodes.....	27
II.1. Préparation des extraits	27

II.1.1. Préparation de l'EMPG.....	27
II.1.2. Préparation de l'EEPG.....	27
II.1.3. Préparation de l'EBPG.....	27
II.2. Tests phytochimiques.....	29
II.3. Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM).....	31
II.4. Dosage des polyphénols totaux.....	34
II.5. Dosage des flavonoïdes.....	36
II.6. Evaluation de l'activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre DPPH).....	37
II.7. Evaluation de l'activité antibactérienne	40
II.7.1. Méthode d'évaluation (méthodes des disques).....	40
II.8. Etude statistique	44

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Etude phytochimique	45
I.1. Rendements des extraits	45
I.2. Tests phytochimiques	46
I.3. Résultats de l'étude qualitative par CCM	50
I.4. Dosage des polyphénols totaux	53
I.5. Dosage des flavonoïdes	55
II. Evaluation in vitro des activités biologiques	57
II.1. Evaluation de l'activité antioxydante	57
II.2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	59
Conclusion et perspectives	65
Références bibliographiques.....	66

Annexes

Liste des figures

Figure 01 : Structure de base des Flavonoïdes	7
Figure 02 : Structures des tanins hydrolysables et condensés	8
Figure 03 : structure de base des coumarines	8
Figure 04 : Numérotation du squelette carboné des stérols.....	9
Figure 05 : Arbre du grenadier	11
Figure 06 : Fleurs et fruits du Grenadier (<i>Punica granatum</i>).....	11
Figure 07 : La grenade et ses différentes parties	12
Figure 08 : Feuilles du grenadier.....	13
Figure 09 : Fleur de grenadier	13
Figure 10 : Fruit du grenadier (<i>Punica granatum L.</i>)	14
Figure 11 : L'écorce de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	15
Figure 12 : Usages traditionnels du grenadier	17
Figure 13 : Mécanismes antioxydants de <i>Punica granatum L.</i>	20
Figure 14 : Écorce de grenade séchée et la poudre d'écorce après broyage.....	25
Figure 15 : A : Staphylococcus aureus. B : Bacillus Subtilis. C : Pseudomonas aeruginosa. D : Klebsiella pneumonia	25
Figure 16 : Les étapes de la préparation des trois extraits EMPG, EEPG et EBPG	28
Figure 17 : Schéma d'une chromatographie sur couche mince	31
Figure 18 : les étapes de La réalisation d'une chromatographie sur couche mince (CCM)	33
Figure 19 : Calcul du rapport frontal.....	34
Figure 20 : Mode opératoire de dosage des polyphénols.	35
Figure 21 : Photos de dosage des polyphénols.....	35
Figure 22 : Protocole du dosage des flavonoïdes	37
Figure 23 : Forme libre et réduite du DPPH	38
Figure 24 : Protocole de piégeage du radical libre DPPH.....	39

Figure 25 : Photos d'évaluation de l'activité antioxydante.....	39
Figure 26 : la méthode de diffusion des disques	40
Figure 27 : Photos de Préparation de la suspension des souches de référence.....	41
Figure 28 : Photos de le procédé de l'ensemencement.....	42
Figure 29 : Photos d'application des disques au niveau de boites de Pétrie	43
Figure 30 : Mesure de diamètres des zones d'inhibition.....	44
Figure 31 : Rendements des extraits de l'écorce de <i>Punica granatum L.</i>	45
Figure 32 : Photos de chromatogramme résultant de l'analyse des trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG) par CCM sur gel de silice par le système de solvant 1 : (a) à 254 nm, système de solvant 2 : (b) à 254 nm, système de solvant 3 : (c) à 254 nm.....	51
Figure 33 : Photos de chromatogramme résultant de l'analyse des trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG) par CCM sur gel de silice par le système de solvant 1 : (a) à 365 nm, système de solvant 2 : (b) à 365 nm, système de solvant 3 : (c) à 365 nm.....	52
Figure 34 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	53
Figure 35 : Teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg E}$).....	54
Figure 36 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	55
Figure 37 : Teneur en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mg E}$).....	56
Figure 38 : Courbe présentant les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des trois l'extraits (EMPG, EEPG, EBPG)	58
Figure 39 : Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents extraits	60
Figure 40 : Résultats de l'activité antibactérienne de EMPG	60
Figure 41 : Résultats de l'activité antibactérienne de EEPG.....	61
Figure 42 : Résultats de l'activité antibactérienne de EBPG	61

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification botanique de <i>Punica granatum L.</i>	10
Tableau 02 : Souches utilisées dans l'activité antibactérienne.....	25
Tableau 03 : Réactifs chimiques et instrumentations	26
Tableau 04 : Les différents systèmes de solvants utilisés.	32
Tableau 05 : Le rendement de trois extraits de l'écorce de <i>Punica granatum L.</i>	45
Tableau 06 : Résultats des tests phytochimiques sur les trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG)	47
Tableau 07 : Résultats de la CCM des des trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG) par différents systèmes de solvan	51
Tableau 08 : Teneur en polyphénols dans les trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG).....	53
Tableau 09 : Teneur en flavonoïdes dans les trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG)	55
Tableau 10 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les trois extraits de <i>Punica granatum L.</i>	57
Tableau 11 : Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne	59

Liste des abréviations

AAG : Acide acétique glacial.

Abs : Absorbance.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

AC : Anhydrase carbonique.

CCM : Chromatographique sur Couche Mince.

CCl₄ : Chloroforme.

DPPH : 2,2-Diphényl-1- Picrylhydrazyl.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

E : Extrait

EMPG : Extrait méthanolique de *Punica granatum L.*

EEPG : Extrait éthanolique de *Punica granatum L.*

EBPG : Extrait butanolique de *Punica granatum L.*

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

FRAP : pouvoir antioxydant réducteur ferrique.

GN : Gélose Nutritive.

HCl : Acide chlorhydrique.

HPLC : chromatographie liquide à haute performance.

HE : Huiles essentielles.

LDL : lipoprotéines de basse densité.

m₀ : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé.

m₁ : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

Mg EAG/ mg : Equivalent microgramme de l'acide gallique par mg d'extrait.

Mg EQ/mg : Equivalent microgramme de quercétine par mg d'extrait.

MH : Mueller Hinton.

nm : Le nanomètre.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

% PI : Pourcentage d'Inhibition.

PON1 : La Paraoxonase 1.

PON2 : La Paraoxonase 2.

R_f : Rapport frontal.

ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

SOD : Superoxyde dismutase.

Introduction

Introduction

Durant des siècles et même des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son bien-être. Il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tous types de remèdes naturels pour finalement créer un lien de complémentarité avec la nature et élaborer ce que nous appelons aujourd'hui la médecine traditionnelle qui est basée sur l'utilisation des plantes médicinales et leurs substances actives (**Bouabibsa, 2020**). Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de fruits et légumes est négativement associée à la morbi-mortalité des maladies cardio- et cérébrovasculaires et de certains types de cancers (**Tang, 2017**). Le grenadier fait partie des plantes médicinales à bonne efficacité thérapeutique notamment l'écorce de grenade.

La grenade (*Punica granatum L.*) est mieux connue dans certains pays comme le fruit d'Eden (Al-Quran) pour son goût agréable et d'excellentes propriétés bénéfiques pour la santé (**Saeed et al., 2015**). Les fruits de *Punica granatum L.*, les graines, l'écorce et les fleurs sont utilisées au Moyen-Orient et en Asie l'origine de cet arbuste. Depuis plus de quatre millénaires, le grenadier a captivé les civilisations avec son apparence séduisante, ses fruits délectables et ses nombreuses significations symboliques. Son port royal est souligné par le calice en forme de couronne, culminant dans un fruit indubitable (**Elodie, 2009**). La grenade est l'un des fruits riches en composés phénoliques avec une puissante activité antioxydante due aux anthocyanes dont la delphinidine, la cyanidine et les glycosides de pélargonidine qui contribuent au jus de grenade antioxydant, anti-inflammatoire, cardioprotecteur, antimicrobien et anti-infectieux. En effet, la grenade possède, par exemple, des propriétés antioxydantes supérieures à du thé vert (**Mezian, 2009**). Les avantages pour la santé d'une capacité antioxydante élevée ont conduit à une augmentation de la consommation de produits à base de grenade (**Hmid, 2013**).

Il était constaté que la peau de grenade est un sous-produit riche en nutriments et avait l'activité antioxydante la plus élevée parmi les fractions de peau, de pulpe et de graines de 28 types de fruits couramment consommés en Chine, comme déterminé par un test FRAP (**Yunfeng et al., 2006**). C'est pourquoi, nous sommes intéressés à étudier l'écorce de *Punica granatum L.*, où elle représente environ 50 % du poids total du fruit et est une source importante de minéraux, notamment de potassium, de calcium, de phosphore, de magnésium et de sodium ; de polysaccharides complexes et de niveaux élevés de divers composés bioactifs tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes... etc. (**Heena et al., 2018**).

Par conséquent, notre travail vise à faire une comparaison de la composition chimique et des activités biologiques de trois extraits : éthanolique, méthanolique et butanolique de la poudre de l'écorce de *Punica granatum L.* Notre travail est divisé en deux parties :

- La première partie est une étude bibliographique qui se divise en deux chapitres. Dans le premier nous ferons un survol sur la phytothérapie, les plantes médicinales, leur efficacité et leurs effets négatifs dans le domaine médical ainsi que leurs principaux éléments actifs, et nous aborderons la plante *Punica granatum L.*, sa classification, sa répartition géographique, aussi, sa composition chimique. Le second chapitre traitera de diverses activités biologiques telles que l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne.
- La deuxième partie est l'étude expérimentale qui contient deux chapitres. Le premier chapitre comportera la réalisation d'un screening phytochimique de la poudre de l'écorce de *Punica granatum L.*, un dosage par spectrophotométrie UV des polyphénols et flavonoïdes, l'analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM), et enfin une évaluation des activités antioxydante et antibactérienne de cette espèce. Le deuxième chapitre contiendra les principaux résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Etude bibliographique





Chapitre I : Les plantes médicinales et Le grenadier



I. Plante médicinale et phytothérapie

I.1. Définition d'une plante médicinale

La médecine traditionnelle est très ancienne et représente l'ensemble des connaissances, des et des pratiques fondées sur les théories, les croyances et les expériences propres à diverses cultures, et qui sont utilisées pour préserver la santé, diagnostiquer, traiter les maladies physiques et mentales (**Achour et al., 2022**). La phytothérapie apparaît comme l'une des formes les plus utilisées de médecine complémentaire et alternative (**Geeta, 2021**). Les plantes médicinales sont la « colonne vertébrale » de la médecine traditionnelle, ce qui signifie que plus de 3,3 milliards de personnes dans les pays les moins développés utilisent régulièrement des plantes médicinales, selon (**Dif et al., 2022**).

Selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé), dans certains pays en voie de développement d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine, 80% de la population dépend de la médecine traditionnelle (**Vinogradova et al., 2023**).

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces qui peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation. Ces substances peuvent être présentes dans différentes parties de la plante, comme les feuilles, les fleurs, les racines ou les tiges (**Schauenberg et Ferdinand, 2013**).

I.2. Modes d'utilisation des plantes médicinales

Le nom « plante médicinale » a été utilisé dans le monde médical sachant que la majorité des médicaments actuellement utilisés sont issus de plantes par copiage ou extraction semi-synthétique de molécules actives "naturelles". Deux usages différents des plantes médicinales peuvent être distingués :

- ❖ La plante entière ou une partie de la plante est utilisée en l'état sans avoir subi d'extraction physico-chimique préalable. Cette utilisation de la plante médicinale se rapproche des utilisations originelles car on utilise la partie de la plante dans sa globalité et c'est la synergie des actifs contenues dans sa drogue végétale qui permet son effet thérapeutique.
- ❖ La plante entière ou une partie de la plante subit une extraction physico-chimique, par diverses méthodes, décoction, trempage et infusion...etc. On obtient ensuite un extrait aqueux, un extrait hydroalcoolique...etc., et cet extrait est généralement soumis à une étape de séchage. Un extrait sec est alors obtenu (**Limonier, 2018**).

Actuellement, en plus des techniques plus traditionnelles, des méthodes d'extraction modernes sont utilisées, telles que les méthodes d'extraction assistée par ultrasons et par fluide supercritique. De plus, le développement d'outils avancés pour l'évaluation qualitative et quantitative des composés phytochimiques, tels que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) permettant l'amélioration de l'étude phytochimique (Marrelli, 2021).

I.3. Avantages des plantes médicinales par rapport aux drogues de synthèse

Actuellement, malgré des avancées significatives dans le domaine de la synthèse chimique, l'intérêt de la médecine scientifique pour les médicaments à base de plantes reste élevé. Dans certains groupes pharmaceutiques, la part des médicaments à base de plantes est encore plus élevée, par exemple, environ 70 % des médicaments utilisés pour traiter les maladies cardiovasculaires sont à base de plantes. Dans la Fédération de Russie, environ 40 % du nombre total de médicaments utilisés en médecine pratique sont des médicaments à base de plantes. Ses avantages par rapport aux drogues de synthèse sont :

- ✓ Un large spectre d'action.
- ✓ Un coût relativement faible.
- ✓ Une biodisponibilité élevée.
- ✓ Une faible toxicité lorsqu'elles sont utilisées de manière rationnelle.
- ✓ Une probabilité moindre d'effets secondaires.
- ✓ La possibilité d'une utilisation à long terme.

À l'heure actuelle, l'intérêt pour l'étude des herbes médicinales continue d'augmenter (Courric, *et al.*, 2023).

I.4. La phytothérapie

Étymologiquement, du grec « phyton » qui signifie plante et « therapein » qui signifie soigner (Jorite, 2015). La phytothérapie a été définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la discipline médicale qui permet le bon usage, à des fins préventives ou curatives, des plantes médicinales et de leurs dérivés, en relation avec les propriétés pharmacologiques de leurs propriétés (Allegra *et al.*, 2023). Les drogues végétales contiennent des ingrédients actifs, Ces ingrédients actifs protègent les plantes contre les dommages et les maladies et contribuent à l'arôme, à la saveur et à la couleur des plantes. Scientifiquement, ils sont connus comme des composés phytochimiques qui comprennent

plusieurs classes telles que les saponines, les flavonoïdes, les glycosides, les tanins, les alcaloïdes et les terpénoïdes. Les composés phytochimiques ont été scientifiquement validés au fil des ans pour offrir des avantages pour la santé humaine (Msoni *et al.*, 2018). La phytothérapie a été utilisée pour lutter contre la pandémie mondiale actuelle de COVID-19 causée par le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SRAS-CoV-2), guérissant jusqu'à 85,2 % des cas (60 107 cas), entraînant des résultats positifs à toutes les étapes de la maladie (Vinogradova *et al.*, 2023). La phytothérapie se présente sous plusieurs formes selon la façon d'extraction de la drogue végétale :

- ✓ Tisane
- ✓ Forme sèche : Gélules et comprimés à avaler.
- ✓ Formes liquides : sirops, macérâts, teintures, extraits liquides.
- ✓ Pommades, crèmes, onguents (Limonier, 2018).

On distingue deux types de phytothérapies :

❖ La phytothérapie traditionnelle

C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement (Amroune, 2018). En effet, les principes actifs n'ont été isolés qu'au début du XIX^{ème} siècle, et jusqu'à cette date, les plantes ou des parties de plantes ont été utilisées telles quelles, subissant des transformations mineures (macération, infusions, alcoolisation...etc.) (Jorite, 2015).

❖ La phytothérapie clinique

C'est une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet (Amroune, 2018). Elle est basée sur la purification et l'isolement de substances et la détermination précise des mécanismes d'action pharmacologique sur des récepteurs, des cellules ou des organes (Jorite, 2015).

I.4.1. Les avantages de La phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages.

- ✚ Les médicaments de phytothérapie sont dérivés de matières végétales relativement inoffensives que le corps humain peut facilement digérer.

- ✚ Parfois, les médicaments synthétiques conventionnels qui sont utilisés pour le traitement des patients souffrant de maladies chroniques peuvent être remplacés par des médicaments de la phytothérapie. Ceci est vital car leurs homologues synthétiques ont souvent des effets secondaires considérables.
- ✚ Les plantes médicinales, en association avec le système immunitaire du corps humain, ont tendance à créer un processus de désintoxication uniforme (**Mudasir et al., 2019**).
- ✚ La phytothérapie est coûtée beaucoup moins cher que de nombreux médicaments pharmaceutiques. Le faible coût de la phytothérapie la rend beaucoup plus accessible à tous.
- ✚ Les plantes médicinales peuvent être utilisées comme nourriture et médicament. Elles sont riches en nutriments et en propriétés bénéfiques pour la santé, ce qui les rend utiles non seulement comme médicament mais aussi comme aliment (**Site web 1**).
- ✚ Un autre avantage des plantes médicinales est leur disponibilité. Les herbes sont disponibles sans ordonnance, et certaines herbes simples, comme la menthe poivrée et la camomille, peuvent être cultivées à la maison (**Site web 2**).

I.4.2. Les inconvénients de la phytothérapie

La phytothérapie est une thérapeutique souvent peu toxique mais qui exige un certain nombre de précautions :

- ✚ Parfois, l'auto-dosage de diverses herbes peut entraîner de graves conséquences chez les utilisateurs.
- ✚ Si les herbes requises ne sont pas identifiées correctement, elles peuvent même entraîner un empoisonnement.
- ✚ Les plantes médicinales ne sont pas efficaces pour traiter les urgences et les maladies aiguës. Comme la plupart des médicaments sont conçus pour fonctionner au niveau moléculaire de la physiologie, le médicament prend son temps pour produire des résultats. Cependant, il existe peu de médicaments à base de plantes qui fonctionnent instantanément dans des conditions aiguës comme la diarrhée... etc. (**Mudasir et al., 2019**).
- ✚ Les plantes médicinales contiennent des substances actives puissantes potentiellement dangereuses si elles ne sont pas utilisées à bon escient (**Limonier, 2018**).

I.5. Les principaux actifs des plantes

I.5.1. Définition

C'est une molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal. Le principe actif est contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétale. Une drogue végétale en l'état ou sous forme de préparation est considérée comme un principe actif dans sa totalité, que ses composants ayant un effet thérapeutique soient connus ou non. Les principes actifs se retrouvent inégalement dans toutes les parties de la plante (Bouabibsa, 2020).

I.5.2. Les principaux éléments actifs des plantes

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais les principaux sont les polyphénols totaux y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les stéroïdes, les stérols, les terpènes...etc. (Bouabibsa, 2020).

a) Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont typiquement des métabolites secondaires des végétaux. Ils sont d'une très grande diversité chimique Ils renferment tous de l'azote dans leur molécule et présentent en général une réaction alcaline (d'où leur nom). Ils sont souvent toxiques, même pour la plante qui les produit, ils sont donc stockés dans des territoires cellulaires particuliers (vacuoles, laticifères) (Heller *et al.*, 2023).

b) Les flavonoïdes

Les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques (Figure 01). Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Bouabibsa, 2020).

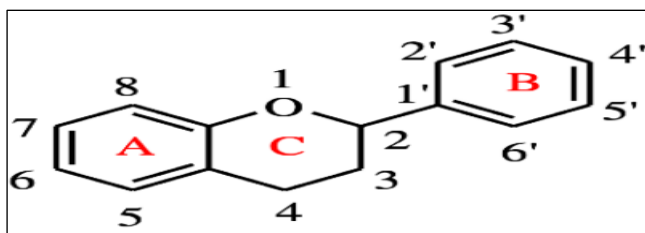


Figure 01 : Structure de base des Flavonoïdes (Bouabibsa, 2020).

c) Les saponosides (saponines)

La combinaison d'un triterpène hydrophobe et d'un glucide hydrophile confère aux saponosides qui, lorsqu'ils sont agités avec de l'eau, produisent une mousse savonneuse. Le

terme de saponoside est dérivé de la saponaire (Saponaria) qui était jadis utilisée comme substitut du savon (Hopkins *et al.*, 2003).

d) Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes. Ces composés sont naturellement produits par les plantes et se caractérisent par leur facilité à se combiner aux protéines. En général, ils sont divisés en deux groupes les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Figure 02) (Formica et Regeson, 1995).

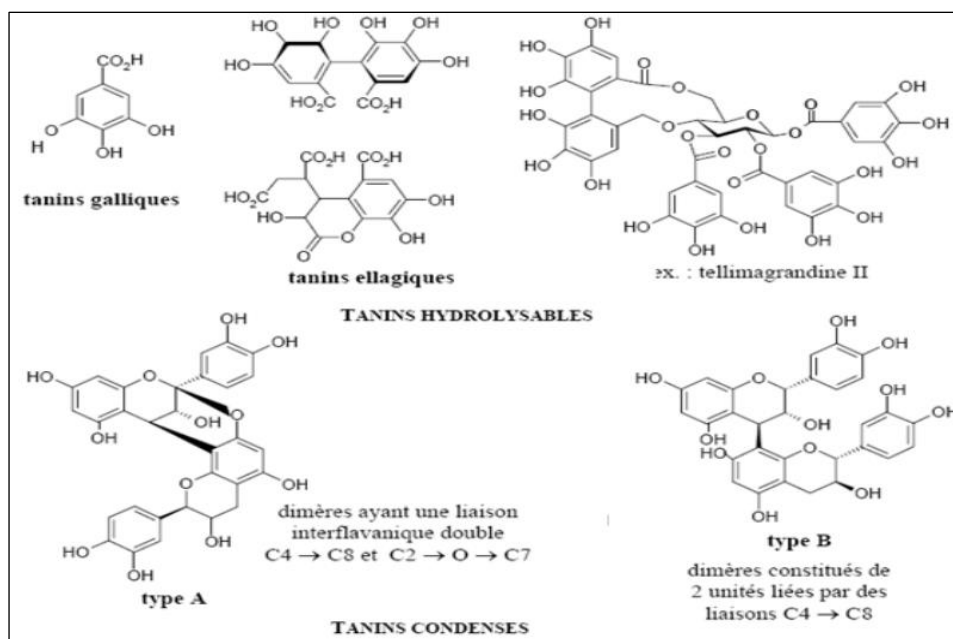


Figure 02 : Structures des tanins hydrolysables et condensés (Charik et Kadri, 2020).

e) Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (Figure 03) (Nsemi, 2010). Les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes. Les coumarines se trouvent dans nombreuse espèces végétales, et des substances naturelles organiques aromatiques (Bouabibsa, 2020).

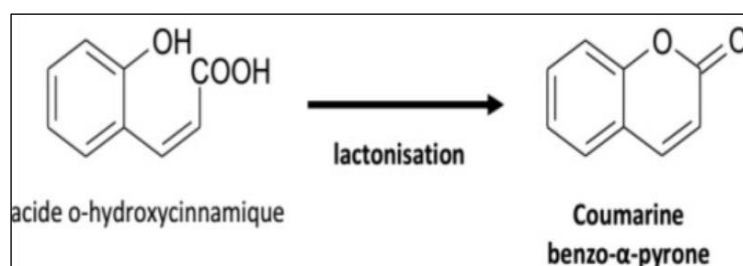


Figure 03 : structure de base des coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

f) Les stéroïdes et les stérols

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques et qu'ils possèdent moins de 30 atomes de carbone. Les stéroïdes qui possèdent un groupement alcool, ce qui est le cas chez pratiquement toutes les plantes, sont appelés **stérols** (Figure 04). Les stérols les plus abondants chez les plantes supérieures sont le stigmastérol et le sitostérol (**Hopkins et al., 2003**).

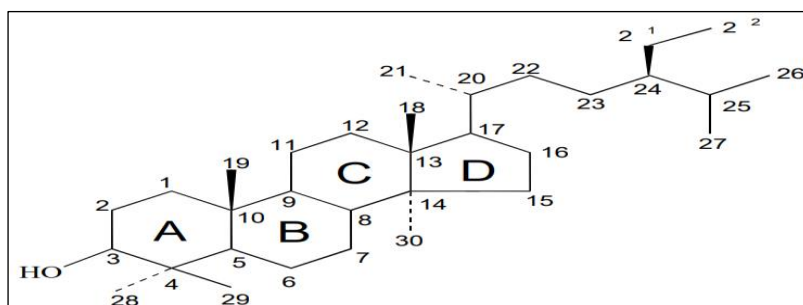


Figure 04 : Numérotation du squelette carboné des stérols (**Noiriel, 2004**).

g) Anthraquinone

Les anthraquinones, également appelées anthracènediones ou dioxoanthracènes, sont des membres importants de la famille des quinones. Les anthraquinones et leurs dérivés produits sous forme de métabolites secondaires, se présentent soit sous forme libre, soit sous forme de glycosides (**Fouillaud et al., 2017**).

h) Les quinones libres

Les quinones sont des molécules très réactives, à noyaux aromatiques, avec deux substitutions cétoniques. Elles sont des composés qui régénèrent des radicaux libres, et par conséquent se complexent irréversiblement aux acides aminés nucléophiles des protéines (**Hamliche, 1988**).

i) Les terpénoïdes et les terpènes

Les composés terpénoïdes constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux. Les terpènes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbone (**Hopkins et al., 2003**). Ils sont une classe d'hydrocarbures produite par de nombreuses plantes. Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 et ont pour formule de base des multiples de celle-ci (**Charik et Kadri, 2020**).

j) Les huiles essentielles

Beaucoup de plantes produisent des mélanges complexes d'alcools, d'aldéhydes de cétones et de composés terpéniques, désignés par le terme général d'huiles essentielles (HE) (Hopkins *et al.*, 2003). Elles sont appelées aussi essences et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches et les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal. Elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (Bouabibsa, 2020).

II. Le grenadier (*Punica granatum L.*)

II.1. Classification botanique

La grenade (*Punica granatum L.*) est un arbre appartenant à la famille des *Punicaceae* d'une hauteur d'environ 3 à 6 m (Figure 05) (Jesús *et al.*, 2020). Le genre *Punica*, décrit pour la première fois en 1753 par Linnaeus, avait des ancêtres tropicaux proches des Lythraceae et des sonneratiaceae, la taxonomie actuellement acceptée est conforme à celle de l'APG-III, selon laquelle *Punica* est traité comme un genre inclus dans la famille des Lythraceae (Lahouel, 2022). La classification classique et phylogénétique de *Punica granatum L.*, a été établie quant à elle, est déterminée comme indiqué dans le tableau 01 :

Tableau 01 : Classification botanique de *Punica granatum L.*, (Lahouel, 2022).

Règne	Plantae
Sous-règne	Phanérogames
Division	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Lythraceae
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica granatum L.</i>



Figure 05 : Arbre du grenadier (Hmid, 2013).

II.2. Composition chimique des différents organes du grenadier

Le grenadier (*Punica granatum L.*), un gros buisson ou arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de bel aspect. Il est depuis longtemps cultivé à but ornemental et pour ses fruits comestibles. Ses fruits possèdent de nombreuses graines, chacune enrobée dans une pulpe gélatineuse rouge cramoisi, le tout entouré dans une peau (écorce) coriace dont la couleur peut aller du jaune au rouge foncé (Figure 06) (Ferhat et Saadaoui, 2022).

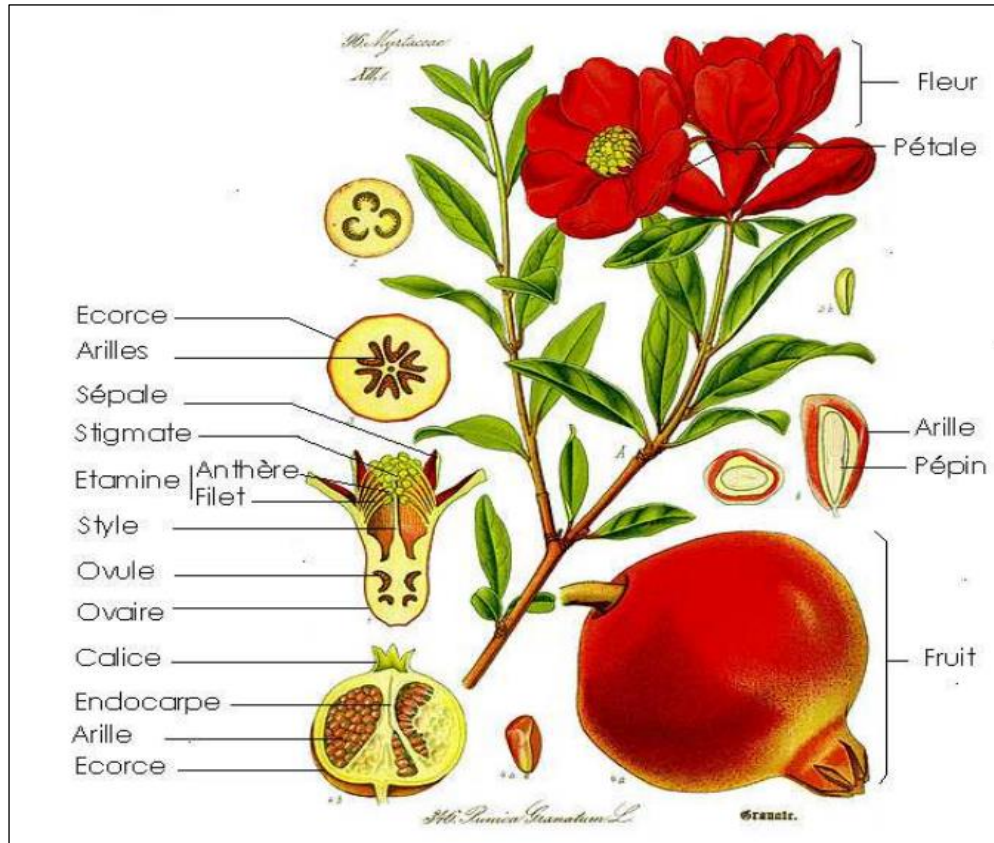


Figure 06 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum*) (Hmid, 2013).

Déjà au XIX^{ème} siècle, le grenadier a suscité l'intérêt des chercheurs qui, par des moyens très primitifs, ont découvert certains principes actifs de cet arbre, comme le Peletierina. Grâce à des méthodes d'analyse chimique relativement nouvelles telles que la chromatographie, la résonance magnétique et même la spectrométrie de masse, il a été possible de déterminer avec précision la composition des différents organes de la grenade (**Reguieg, 2019**). La grenade possède dans ses différentes parties de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée : écorce, membranes blanches, arilles et graines (Figure 7).

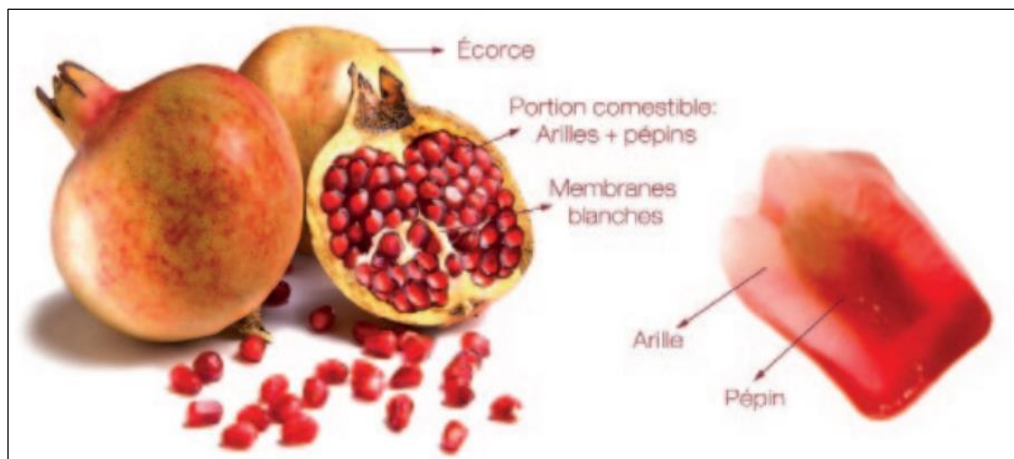


Figure 07 : La grenade et ses différentes parties (**Ángel et Carbonell, 2017**).

II.2.1. L'écorce de la racine

L'écorce de la racine du grenadier a été analysée pour la première fois par mitouart en 1824, qui a trouvé beaucoup de matières grasses, des tanins, de l'acide gallique, des substances résineuses, du mannitol, du sucre et « du ligneux », puis, en 1831, La tour de Trié trouva dans cette écorce de la chlorophylle, beaucoup de résine, des tanins, du gras et une substance cristalline sucrée qu'il appela "grenadine". En 1878, le pharmacien français Charles tanr et découvrit dans cette écorce des alcaloïdes, dont il nomma la principale pelletérine et trois autres, qu'il nomma iso pelletierine, pseudo pelleterine et méthyl pelleterine. Ces alcaloïdes représentent environ 0.70% de l'écorce de racine du grenadier (**Sanaa, 2013**).

II.2.2. Les feuilles

Les feuilles de *P. granatum* sont ovales vert brillant, vivaces et peuvent atteindre 3 cm (Figure 08). Au fil des ans, différentes utilisations traditionnelles des feuilles de grenade ont été enregistrées, et les feuilles de la plante ont des propriétés anti-inflammatoires, anticholinestérasiques et anticytotoxiques. En outre, l'étude a révélé des propriétés antibactériennes et antibiotiques.

De plus, des propriétés antidiabétiques ont également été déterminées et des propriétés anticancéreuses ont été trouvées. Une autre étude a montré des propriétés antipelluculaires et a découvert que l'extrait de feuille pouvait être utilisé pour favoriser la croissance des cheveux. En raison de la variété de leurs effets et propriétés, la grenade a été signalée comme étant riche en alcaloïdes, flavonoïdes et tanins, ainsi qu'en variétés de glucides (Maphetu *et al.*, 2022).



Figure 08 : Feuilles du grenadier (Photo personnelle).

II.2.3. Les fleurs

Les fleurs de grenade fleurissent en été et attirent de différents oiseaux près de leurs arbres. Elles sont marquées avec des pétales ovales empilés rose clair (Figure 09). Les fleurs inclues également des ingrédients bioactifs tels que les tanins, les terpènes, les terpénoïdes, les flavonoïdes et des huiles organiques. Les tanins typiques trouvés dans les fleurs sont les acides ellagiques, punicatannin C et l'acide gallique (Nhlanhla *et al.*, 2022).



Figure 09 : Fleur de grenadier (Photo personnelle).

II.2.4. Les fruits

Le grenadier (*Punica granatum*) est une plante originaire d'Iran qui se distingue par ses fruits car c'est une grosse baie sphérique contenant de nombreuses graines enfermées dans une pulpe comestible juteuse recouverte d'une peau rugueuse nuances de vert, jaune et rouge selon le degré de maturité et la variété (Coronado-Reyes *et al.*, 2022), modérément amer et acide, séparé par un péricarpe blanc membraneux (Machado *et al.*, 2023). Couronnés à la base par un calice proéminent, peau ou écorce généralement dure et coriace jaune recouvert de rose clair ou foncé ou riche rouge (Figure 10) (Kumari *et al.*, 2012).



Figure 10 : Fruit du grenadier (*Punica granatum L.*) (Photo personnelle).

II.2.5. Ecorce (Membranes blanches et la partie comestible)

Environ 50% du poids total de la grenade tombe sur la peau et les membranes blanches, qui sont une source très importante de composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitanins, les proantocianidines et les minéraux, principalement le potassium, l'azote, le calcium, le phosphore, le magnésium et le sodium (Sanaa, 2013).



Figure 11 : L'écorce de grenade (*Punica granatum L.*) (Site web 3).

La partie comestible de la grenade représente environ 50% du poids total de la grenade, dont 80% sont l'arille (la partie charnue) et 20% la graine (la partie ligneuse), la composition des graines de grenade est la suivante : eau (85 %) ; sucres (10 %) principalement fructose et glucose ; acides organiques (1,5 %) principalement acide ascorbique, acide citrique et acide malique ; composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes (principalement des anthocyanes). De plus, les graines de grenade sont une excellente source de lipides, car leur teneur en acides gras varie de 12% à 20% de leur poids total (poids sec) (Sanaa, 2013).

II.3. Origine et répartition géographique

Punica granatum est originaire d'Asie, y compris la Géorgie, l'Iran, l'Arménie, l'Azerbaïdjan et l'Afghanistan, où il vit à l'état sauvage depuis plus de 4000 ans, et se distingue des variétés cultivées par des épis et de petits fruits, crée même des peuplements forestiers presque purs. Il est abondant, surtout dans la zone côtière de la mer caspienne. Il se serait propagé jusqu'en Asie Mineure et en méditerranée où on le trouve souvent réparti à divers endroits indépendants sur son territoire. On le retrouve également dans les bas-reliefs égyptiens à partir de 2500 ans, en 1450 avant JC Chr. L'aire de répartition géographique fait aussi le tour de la méditerranée (Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc), il est moins fréquent dans le sud de la France, au Portugal et en Bulgarie et en Crimée. Du même, la culture de la grenade reste très sporadique en Amérique. Il est présent en Californie, Utah, Alabama, Louisiane et Floride (Reguieg, 2019).

II.4. La culture du grenadier

La culture de la grenade est généralement légèrement limitée aux semi-déserts tempéré et subtropical. Il s'adapte naturellement aux régions aux étés chauds et hivers froids. Cette espèce peut supporter des températures extrêmes de -10 à +40 °C (Bayou et Kerroum, 2020).

II.5. Le grenadier en Algérie

En Algérie la grenade est une espèce sous-étudiée au niveau national, qui a le potentiel de croître et de se diversifier dans d'autres régions. Le comportement de ses différentes variétés a montré que l'espèce est parfaitement adaptée aux conditions environnementales de faible et moyenne altitude. Communément connue comme étant un fruit ayant des qualités gustatives et diététiques distinguées. La culture de la grenade en Algérie a augmenté ces dernières années avec une surface de production de 8386 ha de 58.610 tonnes en 2006 sur une surface de production de 11510 ha et de 84.867,6 tonnes., Culturellement, en Algérie le

grenadier est une espèce réservée aux zones nord et ouest. Au cours des dernières années, la production est concentrée dans la zone sud, où se trouvent les vergers, avec plus de 20.377,4 tonnes grenadiers poussent à l'ombre des palmiers dattiers dans le sud algérien (**Meziane, 2018**).

III. La grenade

III.1. La situation économique de la grenade

La grenade a un énorme potentiel de croissance économique (augmentation de la demande) et peut être une alternative pour les fruiticulteurs confrontés aux défis du changement climatique. D'un point de vue global, l'analyse de l'offre de grenade est rendue difficile en raison du manque de des informations cohérentes et actualisées sur les surfaces plantées et les volumes de production des principaux pays producteurs (**Pienaar, 2021**).

III.2. Les variétés de grenade

Les variétés de grenades sont très nombreuses. L'ancienneté de la culture et la zone étendue de cette dernière en sont la cause. Dès le XIII^{ème} siècle, un auteur arabe, Abn-*AlAoun* avait décrit dix variétés cultivées à cette époque en Espagne. Au même siècle, à Bagdad, les agronomes arabes avaient déjà dénombré et décrit les variétés locales en les classant en trois groupes : 1) grenade rouge ; 2) grenade noire ; 3) grenade sucrée (douce). C'était la première tentative d'une classification pomologique des grenades. *Evreïnoff* crée également le premier classement basé sur l'acidité plus ou moins élevée du fruit mûr, une variété douce ou sucrée dont le jus ne contient pas plus de 1% d'acide, et une autre variété aigre-douce ou acidulées, où l'acidité du jus de ces variétés varie de 1% à 2%. En Algérie, aucune étude pomologique particulière n'a été mise en évidence pour recenser les différents cultivars de grenadier. Dans les petits jardins de Kabylie on trouve différents types de grenadiers, dont on ne connaît que le nom local (**Lahouel, 2022**).

III.3. Utilisation de grenade

En plus d'être traditionnellement utilisées dans l'alimentation de tous les jours, les différentes parties de la grenade sont également utilisées en médecine traditionnelle dans de nombreux pays du monde. Depuis quelques années, ce fruit est un candidat potentiel pour le développement de nouvelles stratégies préventives contre l'apparition de diverses maladies. Il existe également d'autres utilisations telles que les teintures naturelles, la décoration et les cosmétiques (Figure 12) (**Bayou et Kerroum, 2020**).

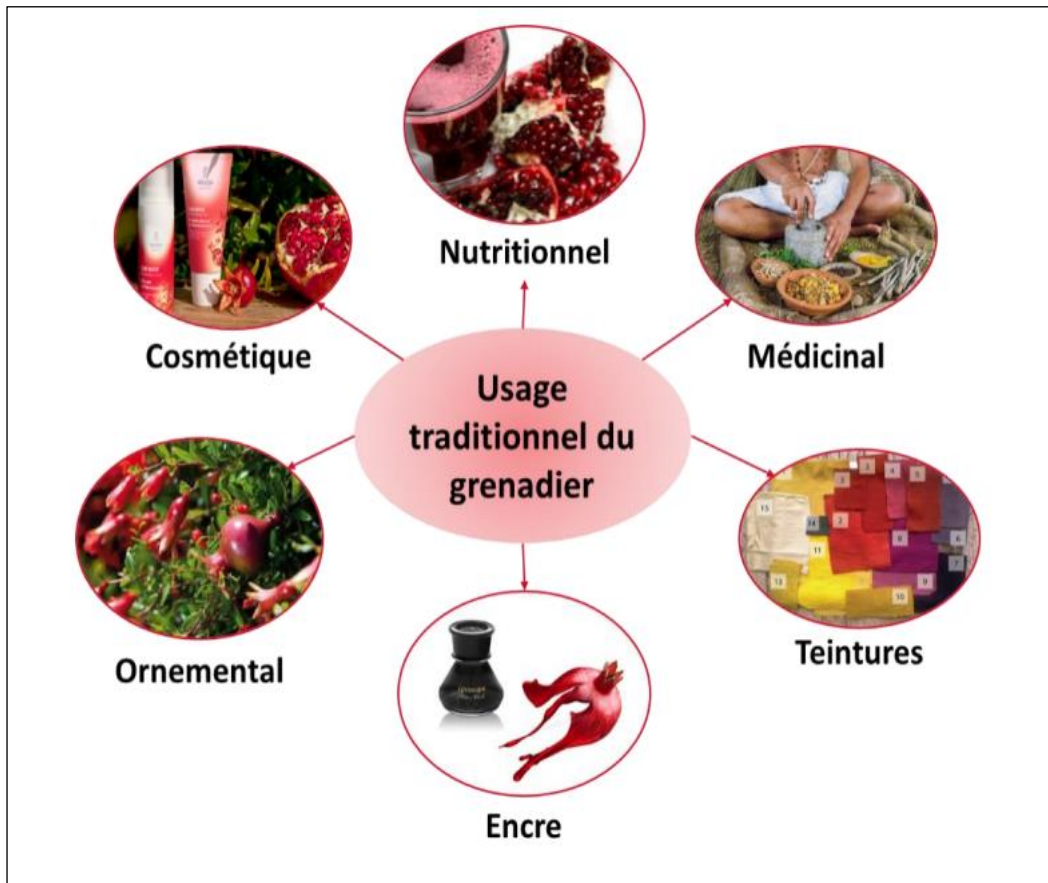


Figure 12 : Usages traditionnels du grenadier (Bayou et Kerroum, 2020).

Chapitre II : Les activités biologiques



I. Généralités

Les produits chimiques bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les antibiotiques, les alcaloïdes, les colorants naturels et divers composants végétaux peuvent être trouvés dans les fruits et les légumes (Sihag *et al.*, 2022). Différentes parties de la grenade comme l'écorce, les feuilles, les fruits immatures et l'écorce des fruits ont une signification médicinale (Arun et Sihag, 2012). *Punica granatum L.* est l'un des fruits avec la plus forte concentration de composés bioactifs. Sa peau, qui représente plus de la moitié du poids du fruit, contient plus de substances bioactives que le composant comestible du fruit (Sihag *et al.*, 2022). Les péricarpes de *P. granatum* contiennent sept inhibiteurs hautement actifs de l'anhydrase carbonique (AC), à savoir la punicaline, la punicalagin, la granatine B, la gallagylidilactone, la punicalagin, la pédonculagin et la tellimagrandine (Arun et Sihag, 2012).

L'écorce de grenade est riche en flavonoïdes et en composés phénoliques tels que les ellagitanins, les gallotanins, l'acide ellagique, l'acide galagique, les catéchines, les anthocyanes, l'acide férulique et la quercétine (Karray *et al.*, 2022). Ces polyphénols présentent diverses activités biologiques : l'activité antioxydante, le piégeage des radicaux libres, l'activité antibactérienne contre les souches pathogènes, les effets immunomodulateurs, les activités antivirales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-thrombotiques, hépatoprotectrices, anti-cancérigènes, vasodilatatrices et réduire le risque de maladies cardiaques et cérébrales, ce ne sont que quelques-uns des avantages pour la santé offerts par les composés phénoliques (Sihag *et al.*, 2022).

II. Activité antioxydante

Les radicaux libres, également connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont produits suite à l'exposition aux rayonnements, aux contaminants environnementaux et aux sous-produits du métabolisme des médicaments. Plus d'un électron non apparié est présent dans les radicaux libres, ce qui les rend instables et hautement réactifs avec d'autres espèces. En général, les processus métaboliques en cours du corps humain entraînent des ERO, qui ciblent spécifiquement les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

Le stress oxydatif est un processus chimique qui peut entraîner des radicaux libres et des événements en cascade qui pourraient endommager les cellules d'un organisme. Ces radicaux sont combattus par des substances appelées antioxydants. Ces derniers sont également connus sous le nom de « piègeurs de radicaux libres » car ils utilisent des radicaux

pour créer de petites espèces réactives. D'une manière générale, on peut définir un antioxydant comme une substance naturelle ou artificielle ayant la capacité de neutraliser et de protéger un système biologique face aux radicaux libres, tels les radicaux de l'oxygène et de l'azote, et les radicaux lipidiques (Ángel et Carbonell, 2017). Ils peuvent être divisés en antioxydants exogènes et endogènes en fonction de leur origine (Alkhatib *et al.*, 2022). Ces propriétés antioxydantes confèrent aux fruits et aux légumes des propriétés bénéfiques pour la santé (Ángel et Carbonell, 2017), et réduit le risque de développer diverses maladies, notamment la néphrotoxicité, le cancer, le diabète, l'inflammation, les maladies du foie et les maladies neurologiques (Alkhatib *et al.*, 2022).

Les antioxydants naturels diffèrent par leur composition, leurs propriétés physiques et chimiques, leurs mécanismes, leurs sites d'action et leurs poids moléculaires. Des molécules simples (acides phénoliques, flavonoïdes, phénylpropanoïdes) aux substances hautement polymérisées (lignines, tanins et mélanines) sont autant d'exemples d'antioxydants naturels. La grenade est une riche source de multiples antioxydants puissants. L'activité antioxydante du fruit de la grenade en fait est l'une des principales plantes médicinales appliquées dans le traitement de nombreuses maladies. Les antioxydants de la grenade se distinguent par des combinaisons d'un large éventail de polyphénols, ayant une plus grande plage d'action contre de nombreux types de radicaux libres.

En générale, diverses expériences ont montré que l'extrait de l'écorce de *Punica granatum* a une activité antioxydante significative et soutient son utilisation comme source d'antioxydants naturels pour lutter contre les pathologies ou les maladies induites par l'auto-oxydation et son utilisation dans l'industrie des aliments de santé /nutraceutique /pharmaceutique pour une variété d'applications et une alternative préférable aux antioxydants synthétiques pour prolonger la durée de conservation des produits alimentaires (Sihag *et al.*, 2022). Des études histopathologiques sur le foie démontrent que l'EMPG de l'écorce est capable d'améliorer l'activité des enzymes hépatiques impliquées dans la lutte contre les ROS (Ferhat Souad et Saadaoui, 2022). Fait intéressant, les composés polyphénoliques de la farine de zeste de grenade sont libérés au cours des différentes étapes de la digestion gastro-intestinale et sont bioaccessibles pour exercer une bioactivité après absorption, principalement en tant que composés antioxydants pour la prévention des maladies de stress oxydatif (Maphetu *et al.*, 2022). La figure 12 résume les mécanismes antioxydants de la grenade.

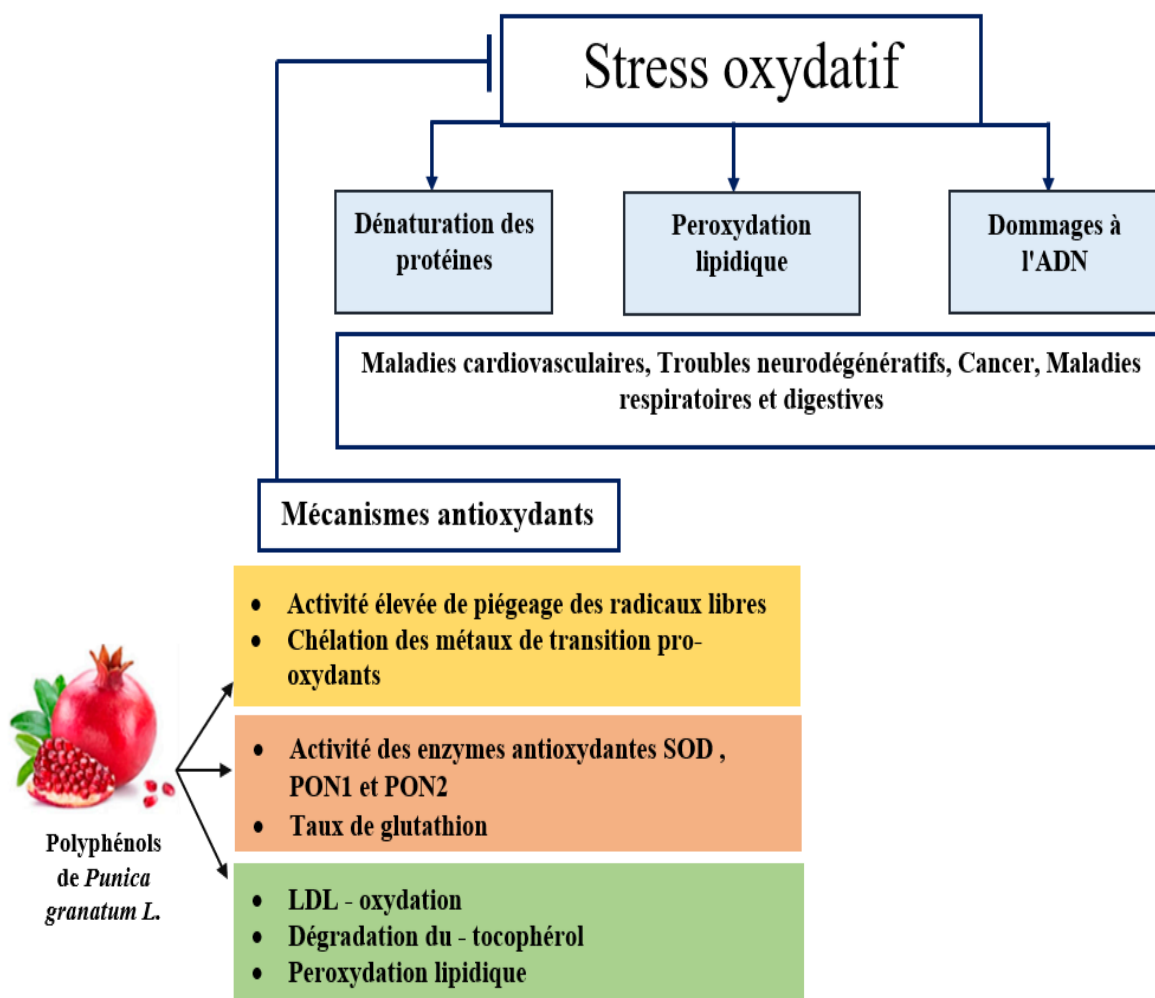


Figure 13 : Mécanismes antioxydants de *Punica granatum L.* (Maphetu et al., 2022).

III. Activité antibactérienne

P. granatum est associé à diverses activités pharmacologiques, notamment des propriétés antifongiques et antibactériennes (Maphetu et al., 2022). Ses différents extraits dans différents solvants présentent une activité antimicrobienne importante (Iskounen et Tadount, 2018), et se sont avérés inhiber la croissance de souches bactériennes Gram-positives et Gram-négatives telles que *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*...etc., (Maphetu et al., 2022). Les extraits de peau de *P. granatum* se sont également révélés être un puissant inhibiteur de croissance de *Listeria monocytogène*, *S. aureus*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*. (Iskounen et Tadount, 2018), et possèdent une forte activité antibactérienne contre la résistance multiple de *Salmonella typhi*. Dans une étude de Dahham et al., les activités antibactériennes et antifongiques de l'extrait de pelure de grenade (écorce), de l'extrait de pépins, du jus et du

fruit entier sur les bactéries et champignons sélectionnés, l'extrait de l'écorce a montré une activité antimicrobienne plus élevée par rapport aux autres extraits. Parmi les cultures bactériennes sélectionnées, l'activité antibactérienne la plus élevée a été enregistrée contre *Staphylococcus aureus* (Arun et Sihag, 2012).

IV. Activité anti-inflammatoire

Punica granatum avec un grand nombre de propriétés biochimiques est associée à une activité anti-inflammatoire (Maphetu *et al.*, 2022). Les compléments alimentaires contenant de l'extrait de grenade deviennent populaires pour le traitement et la prévention de l'arthrite et d'autres maladies inflammatoires (Sarkar *et al.*, 2012). Il y a de nombreuses preuves scientifiques qui démontrent clairement la propriété anti-inflammatoire de l'écorces de grenade. Les extraits de l'écorce de grenade, inhibent l'action des enzymes cyclo-oxygénases et lipo-oxygénases *in vitro*. La cyclo-oxygénase est une enzyme très importante pour la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (PG), qui sont des médiateurs importants de l'inflammation, de sorte que cet acide se trouve fortement inhibé par la consommation d'extraits de l'écorces de grenade en leucotriènes, qui sont d'autres médiateurs de l'inflammation (Ángel et Carbonell, 2017).

V. Activité antidiabétique

Le diabète désigne « un groupe de maladies métaboliques hétérogènes caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion ou de l'action de l'insuline ou des deux conjuguées » (Debbab, 2021). La tentative de découvrir des produits ayant des effets antidiabétiques au cours des deux dernières décennies a impliqué plusieurs produits naturels tels que les extraits de plantes qui étaient traditionnellement utilisés comme médicaments pour le diabète. Il a été démontré que l'extrait de pelure de grenade a des propriétés antidiabétiques. Dans plusieurs études, il a été démontré que la peau de grenade contribue également à l'inhibition des enzymes de digestion des glucides. De plus, il a un effet hypoglycémiant en raison de sa teneur en phénol (Faddladdeen et Ojaimi, 2019). Mayasankaravalli *et al.*, ont étudié les propriétés antidiabétiques de l'extrait aqueux d'écorce de grenade qui s'est avéré efficace pour inhiber le stress oxydatif lié à l'hyperglycémie chronique lié au diabète sucré. De plus, des dosages d'antioxydants, y compris le DPPH et le peroxyde d'hydrogène, ont montré une augmentation des radicaux libres qui sont nécessaires pour augmenter le métabolisme normal afin de prévenir l'hyperglycémie. Dans l'une des études de Ge *et al.*, il a été démontré que les extraits de l'écorce de grenade sont

capables de prévenir le développement du diabète de type 2 en abaissant le taux de sucre dans le sang et en inhibant ainsi l'enzyme alpha-glucosidase (Maphetu *et al.*, 2022).

VI. Activité anti-cancéreuses et anti- tumorale

Les cellules cancéreuses ont la capacité de redevenir des cellules saines par un processus appelé différenciation. Les flavonoïdes peuvent induire cette différenciation avec une toxicité plus faible que les rétinoïdes, ce qui les rend intéressants pour le traitement de la leucémie, pour la lutte contre le cancer de la prostate, et contre d'autres types de cancer tels que celui de l'intestin et du sein. Ainsi, l'écorce de grenade riches en polyphénols ont une activité anti-proliférative (interruption de la croissance tumorale), anti-invasive, antiéicosanoïde, antiangiogène et pro-apoptotique sur des cellules cancéreuses de sein et de la prostate (Debbab, 2021).

VII. Activité antiviral et anti-COVID-19

P. granatum contient des alcaloïdes, des polyphénols et des coumarines qui font partie des composés chimiques associés à la lutte contre la réplication virale et ont des effets virucides (Maphetu *et al.*, 2022). Les extraits de l'écorce de grenade se sont révélés efficaces contre le virus de l'herpès, et les extraits hydroalcooliques de fruits entiers ont montré une activité élevée contre le virus d'influenza (Duman *et al.*, 2009). Dans une étude récente, l'extrait hydroalcoolique d'écorce de grenade (70% d'éthanol) a été étudié pour ses propriétés antivirales en réalisant un test qRT-PCR contre le norovirus humain, et les résultats ont montré que l'extrait hydroalcoolique d'écorce de grenade avait une activité contre les virus humains. De plus, plusieurs études ont été menées pour étudier l'activité inhibitrice potentielle de la grenade contre le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2). L'étude a conclu que les polyphénols d'extrait d'écorce de *Punica granatum* pourraient être utilisés comme inhibiteurs naturels dans la prévention ou le traitement des contagions du SRAS-CoV-2 (Maphetu *et al.*, 2022).

VIII. Prévention des Maladies Cardiovasculaires

L'activité protectrice des polyphénols apportée par l'alimentation contre les maladies cardiovasculaires est due à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, la formation des macrophages et l'athérosclérose (Debbab, 2021). Basu et Penugonda (2009) ont suggéré que le mécanisme principal de grenade en tant qu'anti-athérogénique peut se résumer par les affirmations suivantes :

- ✚ Il augmente l'activité antioxydante du sérum sanguin.

- ✚ Il diminue les lipides du plasma et la peroxydation lipidique.
- ✚ Il diminue l'oxydation du LDL.
- ✚ Il diminue les aires de lésions par athérosclérose.
- ✚ Il diminue la pression artérielle systolique (Ángel et Carbonell, 2017).

IX. Autres propriétés de grenade

Punica granatum a été largement utilisé par la médecine traditionnelle en Amérique, en Asie, en Afrique et en Europe pour le traitement de différents types de maladies (Duman *et al.*, 2009), et il a été utilisé pour traiter des affections allant de l'inflammation et des rhumatismes à la douleur d'un simple mal de gorge. L'utilisation la plus connue dans le monde a été comme agent vermifuge ou ténicide, tueur et expulseur de vers intestinaux (Arun et Sihag, 2012). Il existe des études récentes qui ont mis en évidence l'effet des extraits de l'écorce de grenade sur la prévention de la diarrhée. La consommation de grenade produit une croissance de la concentration de sperme dans l'épididyme, une meilleure mobilité et une plus grande densité de cellules spermatogéniques (Ángel et Carbonell, 2017). De nombreuses études confirment l'importance de la consommation d'extrait d'écorce de grenade, riche en polyphénols, dans le contrôle des troubles métaboliques liés à l'obésité (Louaar, 2017). De plus, *P. granatum* a été largement utilisé pour des applications cosmétiques. A souligné l'utilisation intensive de la grenade et de son écorce pour les produits de soins de la peau, les propriétés anti-inflammatoires aidant les produits induits par les ultraviolets (UV), les produits antirides, la pigmentation et les agents de couleur pour fabriquer des produits de bain (Maphetu *et al.*, 2022).



Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes



L'étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie de l'université Abbès Laghrour - Khenchela - durant la période du 12 Février au 14 Mars 2023. Elle a été fait en deux parties :

❖ **Partie phytochimique :**

- ✓ Préparation de trois extraits : méthanolique (EMPG), éthanolique (EEPG) et butanolique (EBPG) de la poudre de l'écorces (ou peau) de grenade (*Punica granatum L.*).
- ✓ Réalisation des tests phytochimiques sur les différentes préparations.
- ✓ Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.
- ✓ Séparation et identification des divers métabolites par chromatographie sur couche mince (CCM).

❖ **Partie biologique :** Consacrée pour :

- ✓ Etude de certaines activités biologiques des trois extraits : activité antioxydante et activité antibactérienne.

I. Matériel

I. Matériel biologique

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail, comporte l'écorce de fruit de *Punica granatum L.*

I.1.1.1. Récolte et préparation

Les fruits ont été récoltés au mois du décembre au niveau de la région de Chechar, Wilaya de Khenchela, Algérie. 8 kg de fruits frais ont été pelés, nous a permis de l'obtention de 3,5 kg d'écorce. Nous les avons séchées à l'air libre (à l'ombre et à l'abri du soleil à une température ambiante), pour préserver le maximum de l'intégrité des molécules, pendant environ deux mois. L'écorce séchée est broyée jusqu'à l'obtention d'une poudre. Le poids de la poudre obtenue était de 1,3 kg. La poudre est stockée dans des récipients en verre jusqu'à son utilisation en laboratoire.



Figure 14 : Écorce de grenade séchée et la poudre d'écorce après broyage (Photo personnelle).

I.1.2. Souches bactériennes

Afin de tester le potentiel antibactérien *in vitro* de l'EMPG, EEPG et EBPB, quatre souches bactériennes ont été utilisées. Les souches ont été obtenues auprès du laboratoire pédagogique de l'université Abbès Laghrour -Khenchela-.

Tableau 02 : Souches bactériennes utilisées dans l'activité antibactérienne.

Microorganisme	Gram	Code
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923
<i>Bacillus Subtilis</i>	Positif	ATCC 23857
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Négatif	ATCC 13863

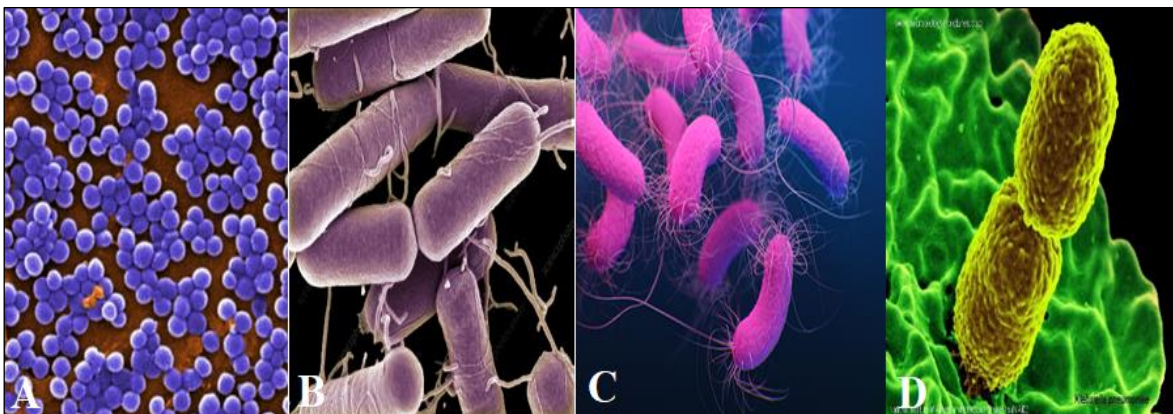


Figure 15 : A : *Staphylococcus aureus*. B : *Bacillus Subtilis*. C : *Pseudomonas aeruginosa*. D : *Klebsiella pneumonia*. (Site web 3).

I.1.3. Réactifs chimiques et équipements

Le tableau (03) représente les réactifs chimiques et les instrumentations utilisés :

Tableau 03 : Réactifs chimiques et instrumentations utilisés.

Réactifs chimiques et solvants	Matériel	Appareillage utilisé
-Méthanol CH ₃ OH	-Bécher	-Balance (KERN PCB)
- Éthanol C ₂ H ₆ O	-Eprouvette graduée	-Agitateur magnétique
-Butanol C ₄ H ₁₀ O	-Pissette d'eau	(SCIOLOGEX)
- Eau distillée	-Spatule	-Evaporateur rotatif (ou
-Acide chlorhydrique HCL	-Barreau Magnétique	rotavap, ou rotavapor)
-Hydroxyde d'ammonium	-Erlenmeyer	-Etuve universelle de 5 à
NH ₄ OH	-Entonnoir	220°C avec ventilation
-chlorure de fer (FeCl ₃)	-Ballon à fond rond	(MEMMERT)
-hydroxyde de sodium (NaOH)	-Cristallisoir	-Réfrigérateurs (Liebherr)
- Anhydride acétique C ₄ H ₆ O ₃	-Boîte de Pétri en verre	-Bain Marie (nüve bath,
- Acide sulfurique H ₂ SO ₄	-Fiole jaugée	MEMMERT)
-Solution de Fehling (solution	-Flacons	-Balance analytique
A et solution B)	-Verre de montre	(OHAUS)
- Chloroforme CCl ₄	-Tubes à essai +	-Chambre d'observation
-Réactif Mayer	Support	UV « 264/365 nm »
-Réactif Wagner	-Papier filtre	(VILBER LOURMAT)
- Acétate d'éthyle C ₄ H ₈ O ₂	-Montier et pilon	-Spectrophotomètre
- Acide formique (ou l'acide	-Pipette graduée	(spectrum SP-UV 2005)
méthanoïque) CH ₂ O ₂	-Micropipette	-Plaque chauffante
-Acide acétique glacial (ou	-Les embout en	(LabTech)
L'acide éthanoïque) C ₂ H ₄ O ₂	plastique, blanc, jaune,	-Vortex (VELP)
-réactif de Folin-Ciocalteu	bleu	-Autoclave (Raypa)
-Carbonate de sodium	-Tube Eppendorf	
(Na ₂ CO ₃)	-Plaque CCM	
-Ttrichlorure d'aluminium	-Boites de pétri	
AlCl ₃	-Anse d'inoculation	
- 2'-diphényle-1-picryl	-Parafilm	
hydrazyl (DPPH)	-Bec bunsen	

-La gélose nutritive		
-La gélose Mueller Hinton		
-Eau physiologie		
-Diméthylsulfoxyde (DMSO)		

II. Méthodes

De différentes méthodes ont été utilisées pour la réalisation de ce travail, de la préparation des EMPG, EEPG et EBPG, passant par l'étude qualitative qui a été réalisée par un screening phytochimique et chromatographie sur couche mince, l'étude quantitative qui a été effectuée par le dosage des flavonoïdes et des polyphénols, jusqu'à l'évaluation *in vitro* des activités antioxydante et antibactérienne des différents extraits.

II.1. Préparation des extraits

II.1.1. Préparation de l'EMPG

La préparation de l'EMPG est réalisée par macération à froid de 40 g de poudre végétale (la poudre de l'écorce de *Punica granatum L.*) est mélangée avec 200 ml d'une solution hydro-alcoolique (8 : 2 V/V) c'est-à-dire (méthanol 160 ml / eau distillée 40 ml) dans un bécher, puis un barreau magnétique est ajouté. La préparation a été couverte par un parafilm et le bécher entier par un papier d'aluminium, le tout est placé sur un agitateur magnétique pendant 24 heures à température ambiante. Après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre, l'extrait a été évaporé à sec sous pression réduite à 40°C grâce à un évaporateur rotatif, puis séché dans l'étuve à 50°C pour obtenir un extrait assez dense. L'extrait est ensuite conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Préparation de l'EEPG

La préparation d'EEPG est réalisée par macération à froid de 40 g de poudre de l'écorces de *Punica granatum L.*, est mélangée avec 200 ml d'une solution hydro-alcoolique (éthanol 160 ml / eau distillée 40 ml). Le protocole est suivi de la même manière que pour la préparation de l'EMPG.

II.1.3. Préparation de l'EBPG

La préparation d'EBPG est réalisée par macération à froid de 40 g de poudre de l'écorces de *Punica granatum L.* est mélangée avec 200 ml d'une solution hydro-alcoolique (éthanol 160 ml / eau distillée 40 ml). Le protocole est suivi de la même manière que pour la préparation de l'EMPG.

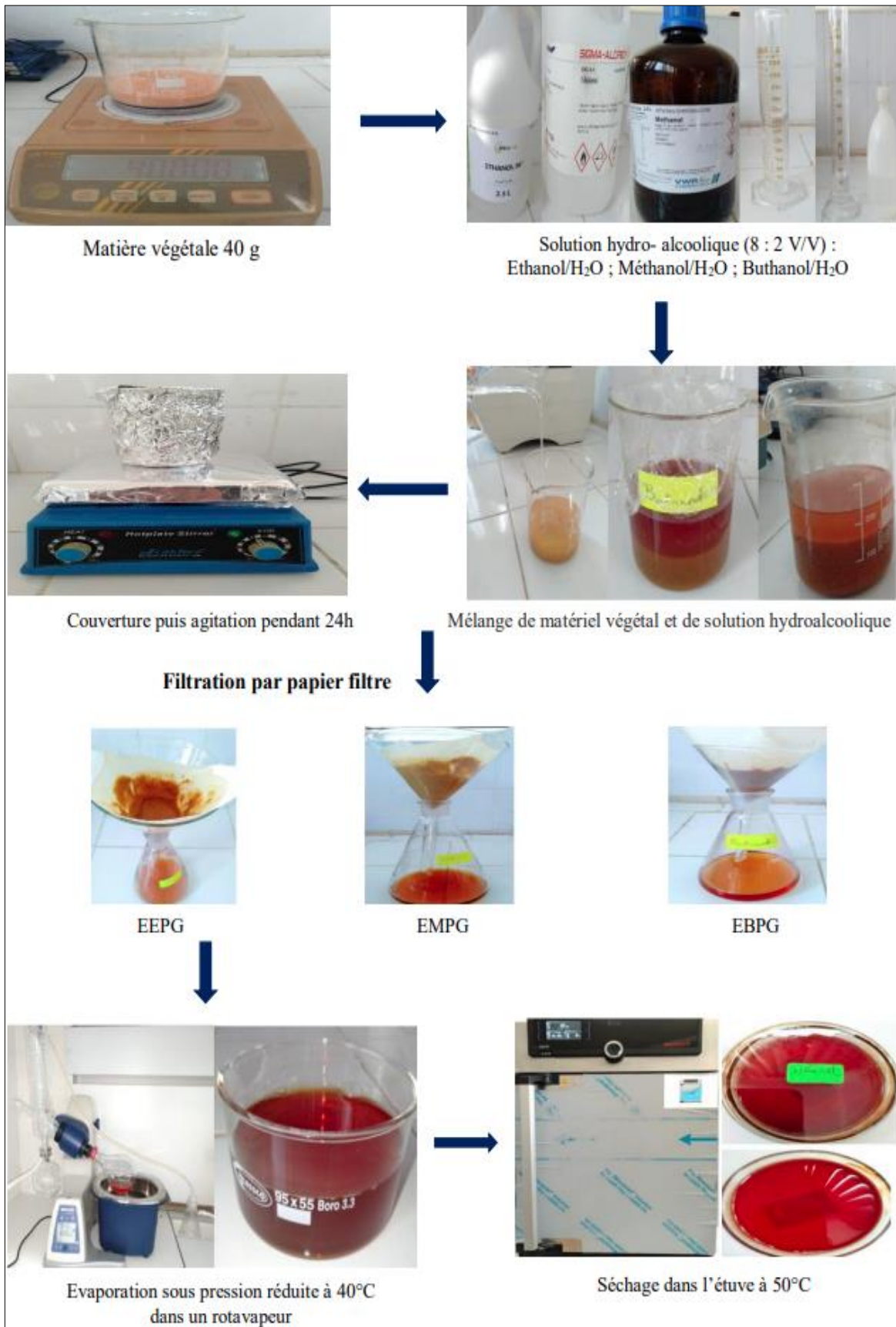


Figure 16 : Les étapes de la préparation des trois extraits EMPG, EEPG et EBP (Photo personnelle).

Le rendement des extraits a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement}(\%) = m_0/m_1 \times 100$$

m_0 : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé (g).

m_1 : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche (g).

II.2. Tests phytochimiques

Le criblage phytochimique qualitatif des extraits a été réalisé pour identifier les principaux groupes de constituants chimiques (flavonoïdes, saponines, tanins, quinones libres, coumarines, stérols et triterpènes, composés réducteurs, terpénoïdes, alcaloïdes, anthraquinones) présents dans les extraits à l'aide des réactions de coloration, de précipitation et des observations sous lumière ultra- violette. Ces tests ont été réalisés selon les techniques décrites par : **Harborne (1998)** et **Bruneton (1999)**. Chacun des tests a été appliqué aux trois extraits (**EMPG, EEPG, EBP**) et a été répété trois fois pour vérifier l'exactitude des résultats.

✚ Flavonoïdes : test de Shinoda

Dans un bécher, nous avons macéré 10 g de poudre sèche dans 150 ml de HCL dilué (1%), recouvert le bécher du parafilm, l'avons enveloppé dans du papier d'aluminium et laissé sur un agitateur magnétique pendant 24 heures. Ensuite on filtre le mélange et on continue avec le test suivant : on prend 10 ml du filtrat et on ajoute des gouttes de NH_4OH à 10 % pour le rendre basique. L'apparition d'une couleur jaune en haut du tube indique un test positif.

✚ Saponosides : Test de mousse

Dans un tube à essai, nous plaçons 10 ml de l'extrait, puis il a été fermé et agité vigoureusement en position horizontale pendant 15 secondes. Après 15 minutes de repos, la hauteur de la mousse formée a été mesurée. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence de saponines.

✚ Tanins

Dans un tube à essai, nous plaçons 2 ml de l'extrait et ajoutons 0,5 ml d'une solution aqueuse à 1% de chlorure ferrique (FeCl_3). L'apparition d'une couleur vert foncé ou bleu-noirâtre indique la présence de tanins.

✚ Quinones libres

Dans un tube à essai, nous ajoutons 0,5 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) dilué à 1%, à 5 ml d'extrait. L'apparition d'une couleur jaune, rouge ou violette indique la présence des quinones libres.

✚ Coumarines : Fluorescence UV

On prépare deux tubes à essai, dans le premier on introduit 0,5 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) dilué à 10 % avec 1 ml de l'extrait, et dans le deuxième on prépare un extrait non traité au NH₄OH pour servir de témoin. Après dépôt d'une goutte sur un papier filtre, l'apparition d'une fluorescence intense sous lumière ultraviolette (366 nm) indique la présence de coumarines.

✚ Stérols et Triterpènes : test de Liebermann-Burchard

Dans un tube à essai, nous mettons 5 ml d'extrait et y ajoutons 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml d'acide sulfurique. Nous l'incubant pendant 15 minutes. Si la couleur apparaît violette ou verte, cela signifie que le test est positif.

✚ Composés réducteurs

Dans un tube à essai, 1 ml de l'extrait a été mélangé avec 2 ml de solution de Fehling (1 ml de solution A et 1 ml de solution B), suivi d'une incubation dans un bain d'eau bouillante pendant 8 minutes. Un précipité rouge brique indique un test positif.

✚ Terpénoïdes : test de Salkowski

2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à 5 ml d'extrait. La formation de deux phases et l'apparition d'une couleur brune dans l'interphase indique la présence de terpénoïdes.

✚ Alcaloïdes

Des tests de détermination des alcaloïdes par des réactions de précipitation en présence de réactifs alcaloïdes ont été réalisés (Meyer et Wagner). Dans un bécher, des gouttes d'acide chlorhydrique dilué à 1% ont été ajoutées à 1 ml d'extrait, puis la solution a été divisée en deux parties égales dans deux tubes, en ajoutant 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube, et 0,5 ml de réactif de Wagner dans le deuxième tube, un précipité blanc/brun s'est formé, indiquant la présence d'alcaloïdes.

✚ Anthraquinones

Pour détecter la présence d'anthraquinones, 5 ml de l'extrait ont été mélangés avec 5 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH dilué à 10%). Une couleur violette après agitation indique un résultat de test positif.

II.3. Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)

A. Définition

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. Elle est constituée de deux phases fixe et mobile, dans laquelle la phase mobile est un liquide utilisé pour séparer les composants en absorbant les particules à séparer à la surface du support (Figure 17). Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- **La cuve chromatographique** : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- **La phase stationnaire** : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une surface plane (verre, matière plastique ou feuille d'aluminium).
- **L'échantillon** : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 - 5%) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- **L'éluant (la phase mobile)** : un solvant pur ou un mélange qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon (**Aouachria, 2022**).

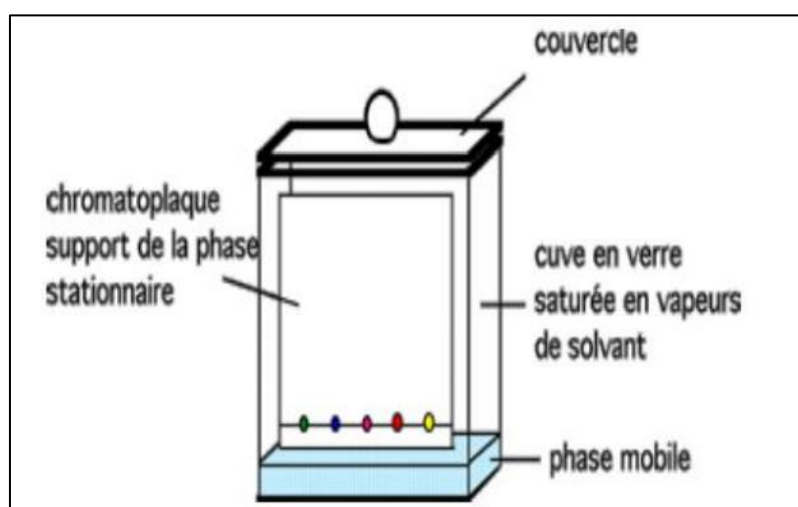


Figure 17 : Schéma d'une chromatographie sur couche mince (**Boutaghane, 2022**).

B. Principe

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (**Antonot et Marchal, 1998**).

C. Mode opératoire

Nous avons utilisé des plaques de silice prêtes à l'emploi avec des supports en aluminium et les avons coupées à la bonne taille d'environ 10 cm de long et 7 cm de large. Nous traçons une ligne horizontale (ligne de base) au crayon, afin de ne pas abîmer le support, à environ 1 cm du bas de la plaque de gel de silice, appelée ligne de dépôt, puis des points sont déterminés à la ligne de dépôt et à l'aide d'un tube capillaire ou d'une aiguille fine, une petite quantité de la solution de produit est déposée sous forme de points (**Braithwaite et Smith, 1999**). Le tableau 04 contient les différents systèmes de solvants (éluant) utilisés lors de l'analyse CCM.

Tableau 04 : Les différents systèmes de solvants utilisés.

Systèmes	Solvants
Système 1	Ethyle acétate/acide formique/AAG / eau (25 : 3 : 3 : 7 v/v)
Système 2	N-butanol/eau/acide acétique glacial (4 : 5 : 1 v/v)
Système 3	Acétone /eau (1 :1 v/v)
Système 4	Chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau (16 : 8 : 3 : 2 v/v)
Système 5	Chloroforme/acétone/ammoniaque 10 % (16 : 8 : 3 v/v)
Système 6	Chloroforme/Acétate d'éthyle/acide formique (13 :10 :3 v/v)

Placer la plaque CCM verticalement ou légèrement inclinée dans un récipient en verre contenant l'éluant, la placer contre l'une des parois, l'immerger d'environ 0,5 cm dans la phase mobile, boucher le récipient et laisser jusqu'à la fin du développement. Le solvant monte à travers les capillaires le long de la plaque. Lorsque la migration atteint

approximativement le haut de la plaque, elle est éjectée de la cellule, marquant la ligne de front (où s'est terminée la migration de l'éluant). Séchez la plaque CCM à l'aide d'une ventilation ou d'un sèche-cheveux.

D. Révélation des plaques sous UV

Après le développement, les plaques sont sorties des récipients en verre et séchées, observées sous ultraviolets à 254 nm, et 365 nm avec enregistrement des couleurs d'accompagnement avant et après control sous ultraviolet.



Figure 18 : les étapes de La réalisation d'une chromatographie sur couche mince (CCM)
(Photo personnelle).

E. Calcul du rapport frontal (R_f)

On appelle rapport frontal (R_f) d'une espèce chimique le quotient de la distance h parcourue par l'espèce par la distance H parcourue par l'éluant pendant le même temps.

Pour chaque espèce chimique, le R_f dépend de la phase fixe et de l'éluant.

$$R_f = \frac{\text{Hauteur de migration}}{\text{Hauteur du front du solvant}} = \text{Valeur entre 0 et 1.} \quad \text{Donc } R_f = \frac{h}{H}$$

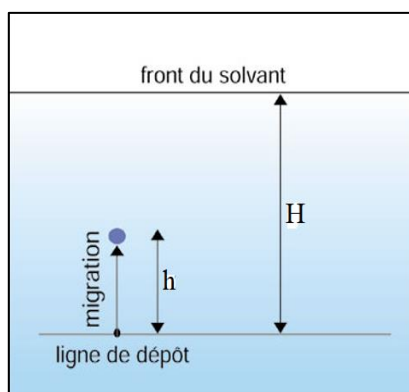


Figure 19 : Calcul du rapport frontal (Boutaghane, 2022).

II.4. Dosage des polyphénols totaux

A. Principe

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses. Les polyphénols sont déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin- Ciocalteu. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

B. Mode opératoire

Le dosage des polyphénols totaux dans les trois extraits (EMPG, EEPG, EBPB) est effectué par la méthode de Folin Ciocalteu. Le protocole de dosage est présenté dans la figure 20.

C. Expression des résultats

La concentration de polyphénols totaux présents dans les trois extraits a été calculé à partir de l'équation de régression pour la gamme de titrage spécifiée dans l'étalon de référence, car il a été déterminé avec des concentrations précises d'acide gallique. Le résultat est exprimé en microgrammes, équivalent à l'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg).

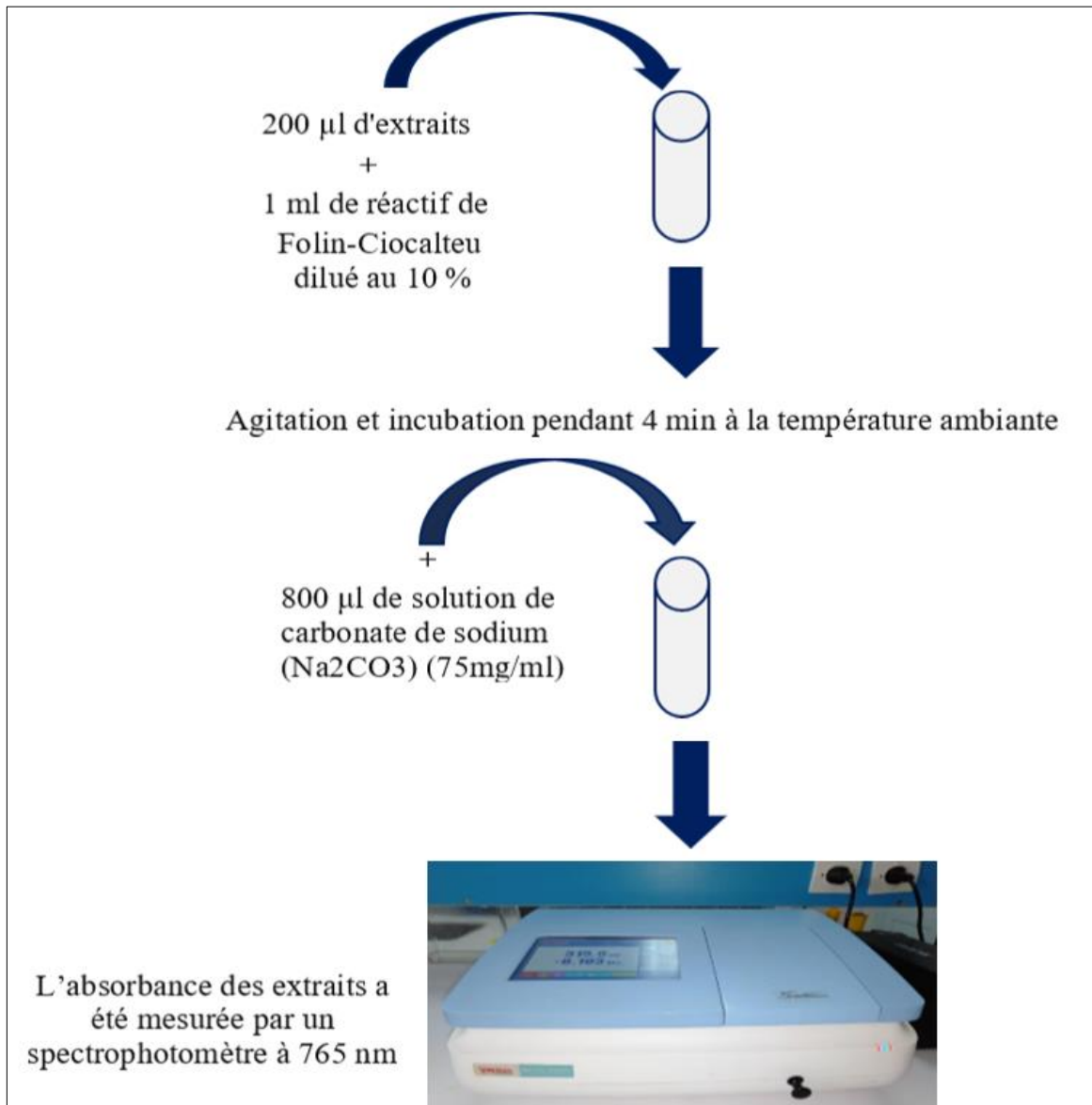


Figure 20 : Mode opératoire de dosage des polyphénols (Bendjersi, 2017).



Figure 21 : Photos de dosage des polyphénols (Photo personnelle).

II.5. Dosage des flavonoïdes

Cette technique spectrophotométrique basée sur la formation de complexes d'aluminium est l'une des techniques les plus utilisées pour la détermination des flavonoïdes totaux. Ceci est dû à la simplicité, rapidité, la reproductibilité et la rentabilité de la technique.

Le dosage des flavonoïdes par l' AlCl_3 est une technique comme toutes les techniques de dosages colorimétriques, qui ont pour but de déterminer la concentration d'une espèce colorée à partir d'une courbe d'étalonnage en utilisant la loi de Beer-Lambert (Messast, 2021). Soit : $A = \epsilon lc$

Soit : $A = \epsilon lc$

- ❖ **A** : Absorbance.
- ❖ ϵ : Coefficient d'absorption molaire en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.
- ❖ **l** : Largeur de cuve en cm.
- ❖ **c** : Concentration de la solution en mol/L.

La quercétine est considérée comme un témoin positif qui a permis d'obtenir la courbe d'étalonnage, par laquelle la teneur en flavonoïdes de différents extraits a été calculée. Le résultat est exprimé en microgrammes, équivalent de la quercétine par milligrammes d'extrait (EMPG, EEPG, EBPG).

A. Principe

Le principe de cette méthode est basé sur la formation de complexes de couleur jaune entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Ceci se traduit par le fait que le métal perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. La couleur jaune présente une absorption maximale à 430 nm (Zine et Amour, 2021).

B. Mode opératoire

La solution d' AlCl_3 est préparée en dissolvant 1 mg de poudre d' AlCl_3 dans 50 ml de méthanol, en suivant la méthode consistant à verser le méthanol progressivement et en diagonale, pas en une seule fois, là où il touche la paroi du bécher, afin de réduire les collisions chimiques. Le protocole de dosage est présenté dans les figures 22 :

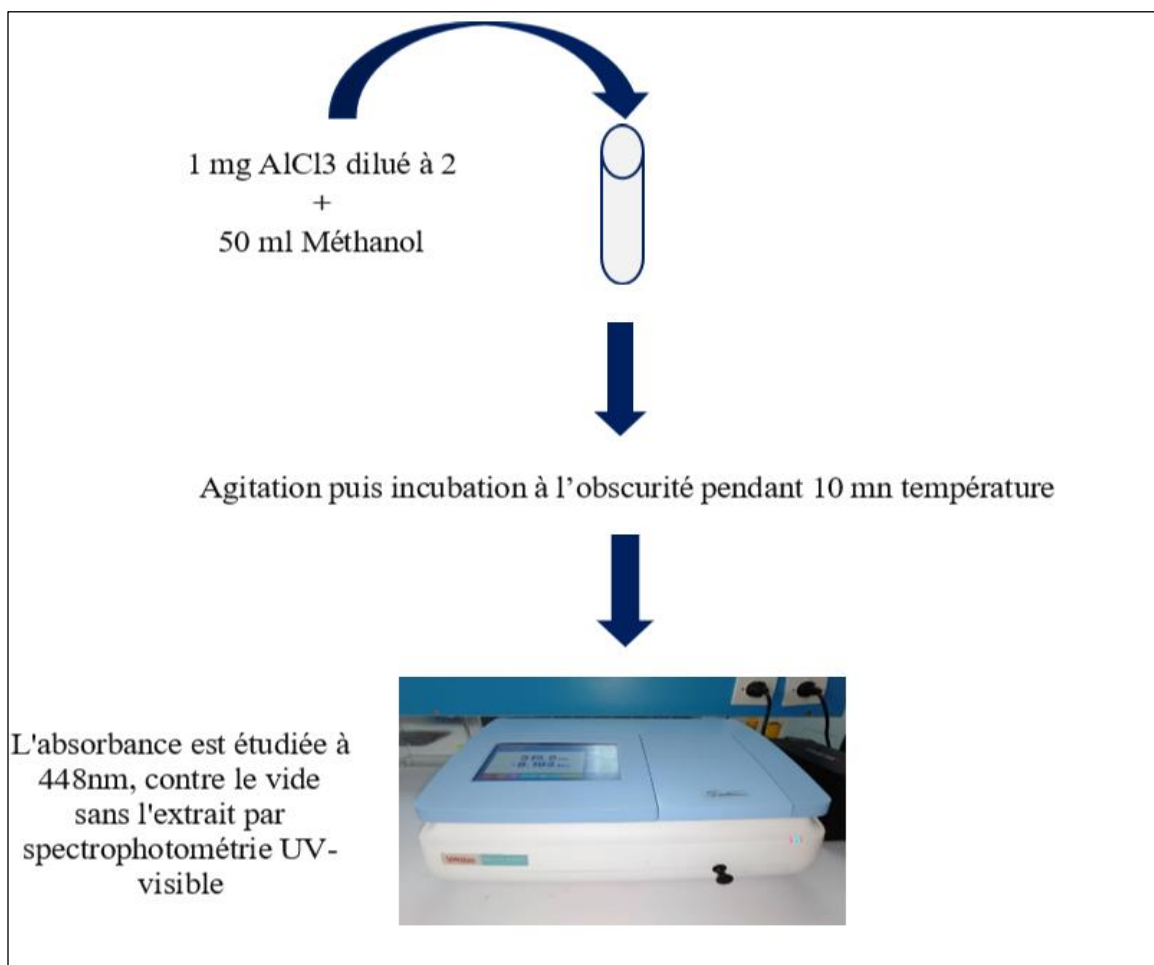


Figure 22 : Protocole du dosage des flavonoïdes (Dejdanne *et al.*, 2006).

C. Expression des résultats

Selon une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = ax + b$) qui a été produite par un étalon de référence « quercétine » avec différentes concentrations, la quantité de flavonoïdes a été déterminée. Les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$).

II.6. Evaluation de l'activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre DPPH)

A. Principe

Le radical 2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. A température ambiante, le radical DPPH présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons (Iskounen et Tadount, 2018).

Le principe de ce test est fondé sur le pouvoir des antioxydants qui jouent le rôle des piègeurs de radicaux libres. En présence de ces antioxydants : soit synthétiques ou naturels le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl), se réduit en 2,2-diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Zine et Amour, 2021). On peut résumer la réaction par le schéma représenté dans la figure 23 suivante :

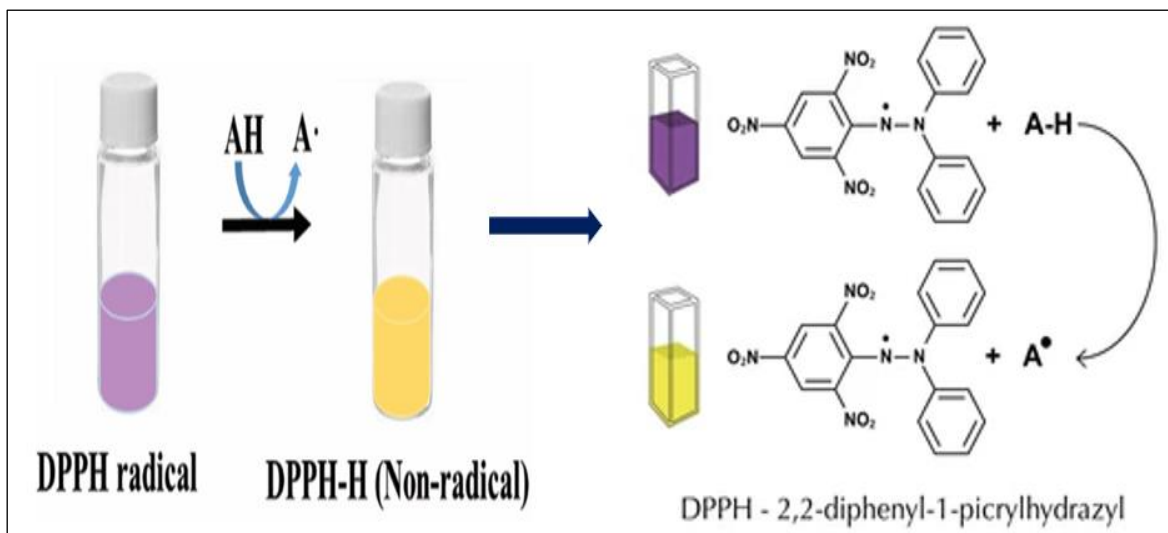


Figure 23 : Forme libre et réduite du DPPH (Cesbron, 2020).

B. Mode opératoire

Le DPPH• 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (C₁₈H₁₂N₅O₆) a été solubilisé dans du méthanol absolu pour avoir une solution de 100 ml. A partir d'une solution méthanolique, éthanoliques et butanolique mère de C₁= 1 mg/ml de l'extrait, les dilutions suivantes ont été préparées : C₂ = 0,7 mg/ml, C₃ = 0,5 mg/ml, C₄ = 0,3 mg/ml, C₅ = 0,1 mg/ml. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. 100 µl de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 900 µl d'une solution méthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 minutes, les densités optiques des mélanges réactionnels ont été mesurées par le spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions par le méthanol. Le Protocole de piégeage du radical libre DPPH est présenté dans les figures 24 et 25.

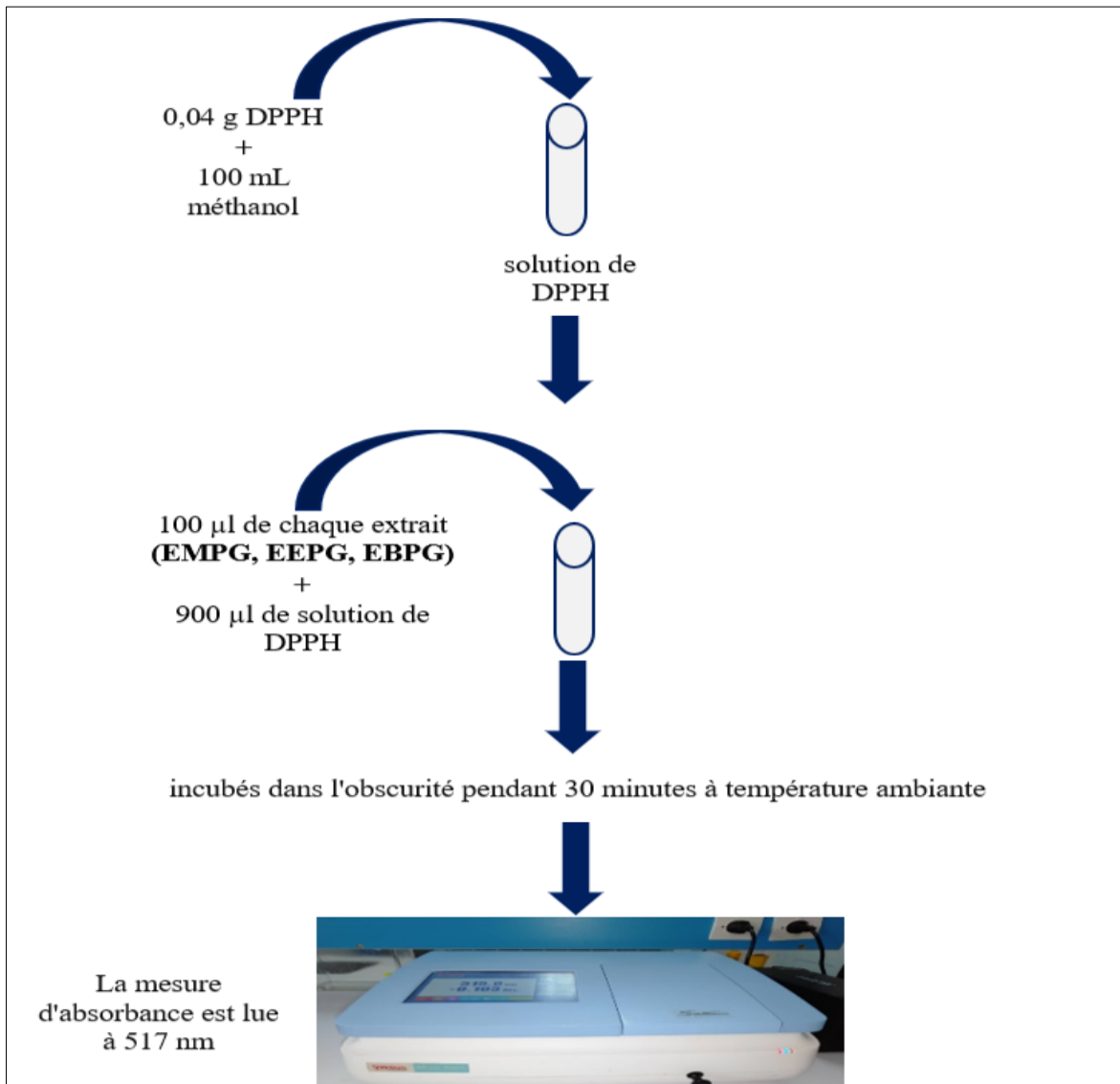


Figure 24 : Protocole de piégeage du radical libre DPPH (Benariba *et al.*, 2013).

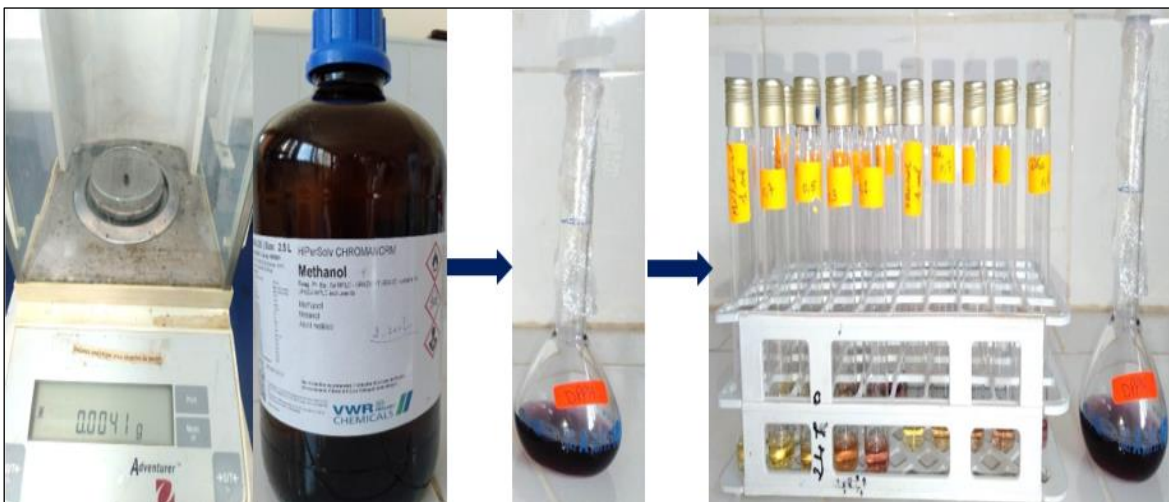


Figure 25 : Photos d'évaluation de l'activité antioxydante (Photo personnelle).

C. Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (% PI). Le % PI du DPPH• a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ PI du DPPH} \bullet = [(Abs \text{ Blanc} - Abs \text{ test}) / Abs \text{ Blanc}] \times 100$$

- ❖ **Abs Blanc** : Absorbance du control négatif lue à 517 nm.
- ❖ **Abs test** : Absorbance de l'échantillon lue à 517 nm.

II.7. Evaluation de l'activité antibactérienne

Dans cette partie, nous nousrecherchons des composés antibactériens synthétisés par l'écorce de *Punica granatum L.*, qui sont connus pour leurs propriétés cicatrisantes. Nous avons utilisé la technique de diffusion en milieu gélosé sur boîtes de pétri en adaptant la méthode de disque décrite par **Bauer et collaborateurs (1966)**.

II.7.1. Méthode d'évaluation (méthodes des disques)

L'étude du pouvoir antibactérien de l'EMPG, EEPG et EBPG par cette méthode est identique à celui de l'antibiogramme.

L'antibiogramme bactérien est réalisé par diffusion en milieu gélosé, aussi appelée méthode du disque (Figure 26), son principe est d'inspiration antibiotique dans le but d'évaluer l'activité antibactérienne par diffusion de l'extrait dans le milieu solide (création d'un gradient de concentration entre le composé et le micro-organisme cible dans une boîte de pétri stérile).

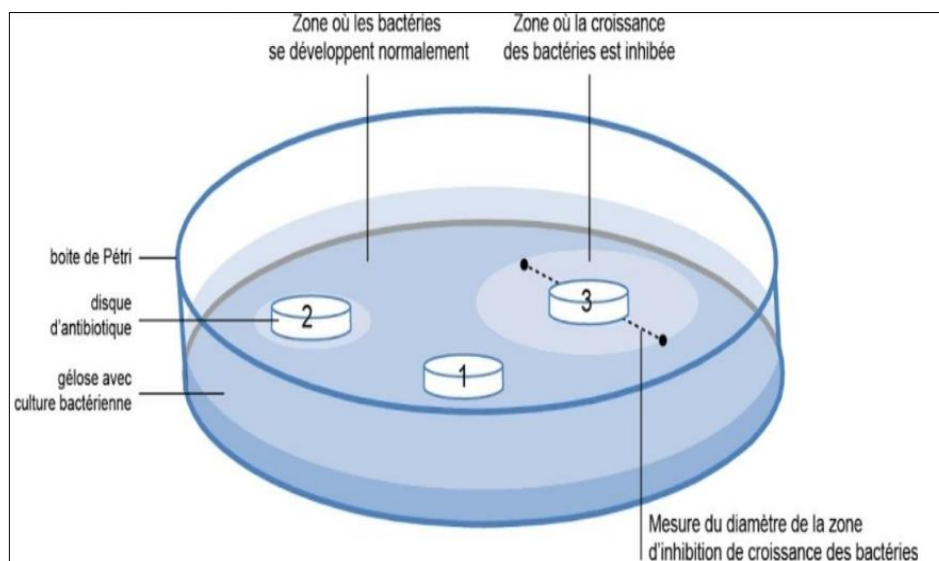


Figure 26 : la méthode de diffusion des disques (Berdoudi, 2021).

A. Préparation pré culture

➤ Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- ✚ La gélose nutritive (GN) (Annex 2) pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- ✚ La gélose Mueller Hinton (MH) (Annex 3) pour l'étude de la sensibilité des bactéries.

➤ Stérilisation des matériels

Dans un autoclave à 121° C pendant 30 minutes, nous avons stérilisé l'eau physiologique et les tubes à essai qui sont utilisés pour préparer les solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium, les flacons contenant des milieux de culture (GN et MH).

B. Préparation de la suspension des souches de référence

On prépare des boîtes de Pétri qui contiennent de la gélose nutritive pour la culture des quatre souches microbiennes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus Subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiellas pneumonia*) et on les incube à 37° C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

On sélectionne 3 à 4 colonies qui se ressemblent et on les isole bien à l'aide d'un anneau platine et elles sont placées dans des tubes contenant 9 ml de l'eau physiologique stérile et mélangés au Vortex jusqu'à ce que la solution devienne homogène (figure 27), sa turbidité est ajustée à 0,5 Mc Ferland (Annex 1) pour chaque microorganisme (les quatre souches bactériennes) lu à 620 nm.



Figure 27 : Photos de préparation de la suspension des souches de référence (Photo personnelle).

C. Ensemencement

Le procédé de l'ensemencement est réalisé en milieu stérile, les étapes sont résumées comme suivant (Figure 28) :

- ✚ Couler environ 20 ml à 25 ml de la gélose Muller-Hinton dans chaque boîte de pétri, à une épaisseur de 4 mm par boîte, et laisser solidifier.
- ✚ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ✚ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✚ Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétri 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- ✚ Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

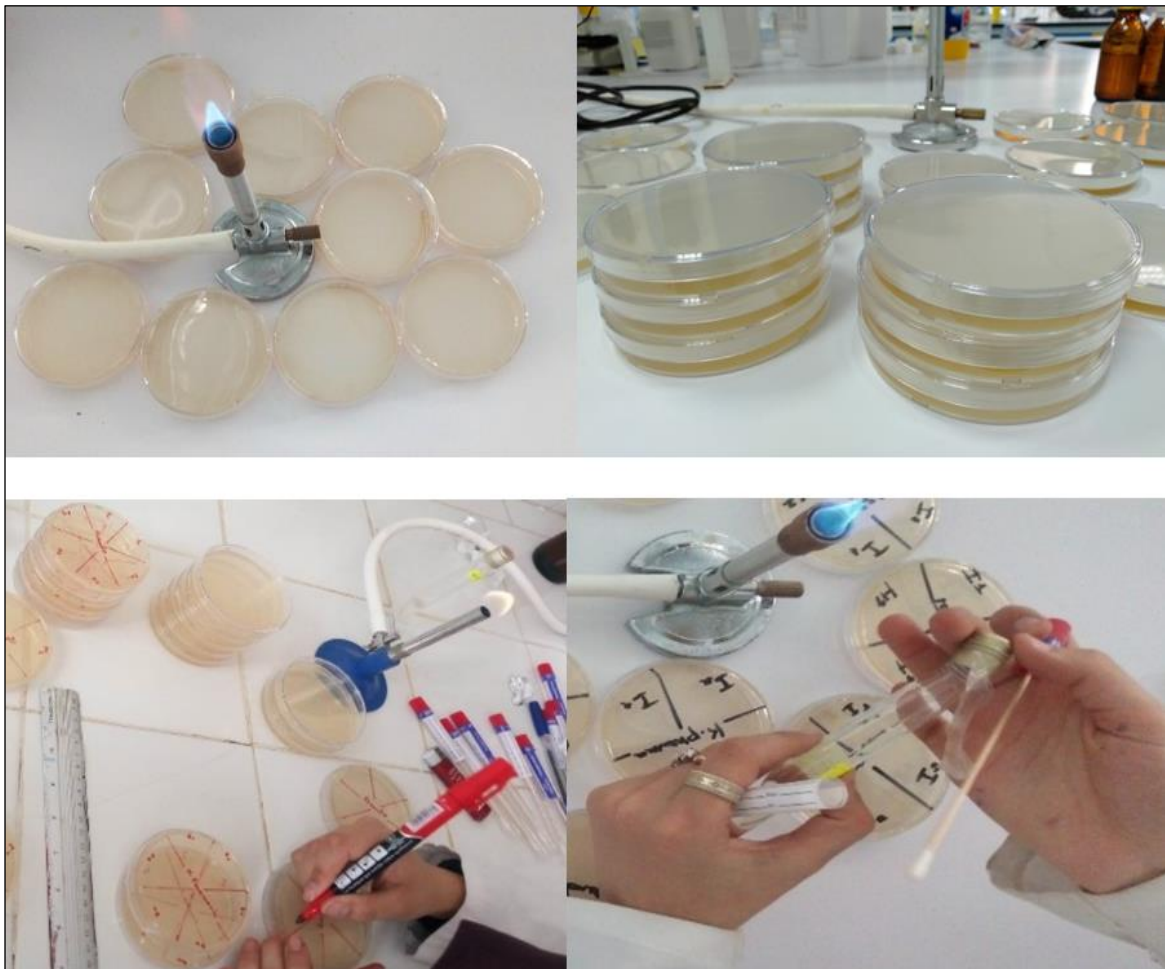


Figure 28 : Photos du procédé de l'ensemencement (**Photo personnelle**).

D. Application des disques

L'opération d'application des disques au niveau de boîtes de Pétrie est résumée dans les étapes suivant (Figure 29) :

- ✚ Des disques de papier filtre de diamètre 6 mm sont imprégnés de l'ordre de 15 μ l d'extraits (EMPG, EEPG, EBPG) à deux différentes concentrations (200 mg et 300 mg) repris dans 1 ml le diméthylsulfoxyde (DMSO).
- ✚ Préparer les disques de contrôle négatif imprégnés de diméthylsulfoxyde (DMSO).
- ✚ Les disques imprégnés de nos extraits sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose à l'aide de pinces stériles. Il en est de même pour les disques du contrôle.

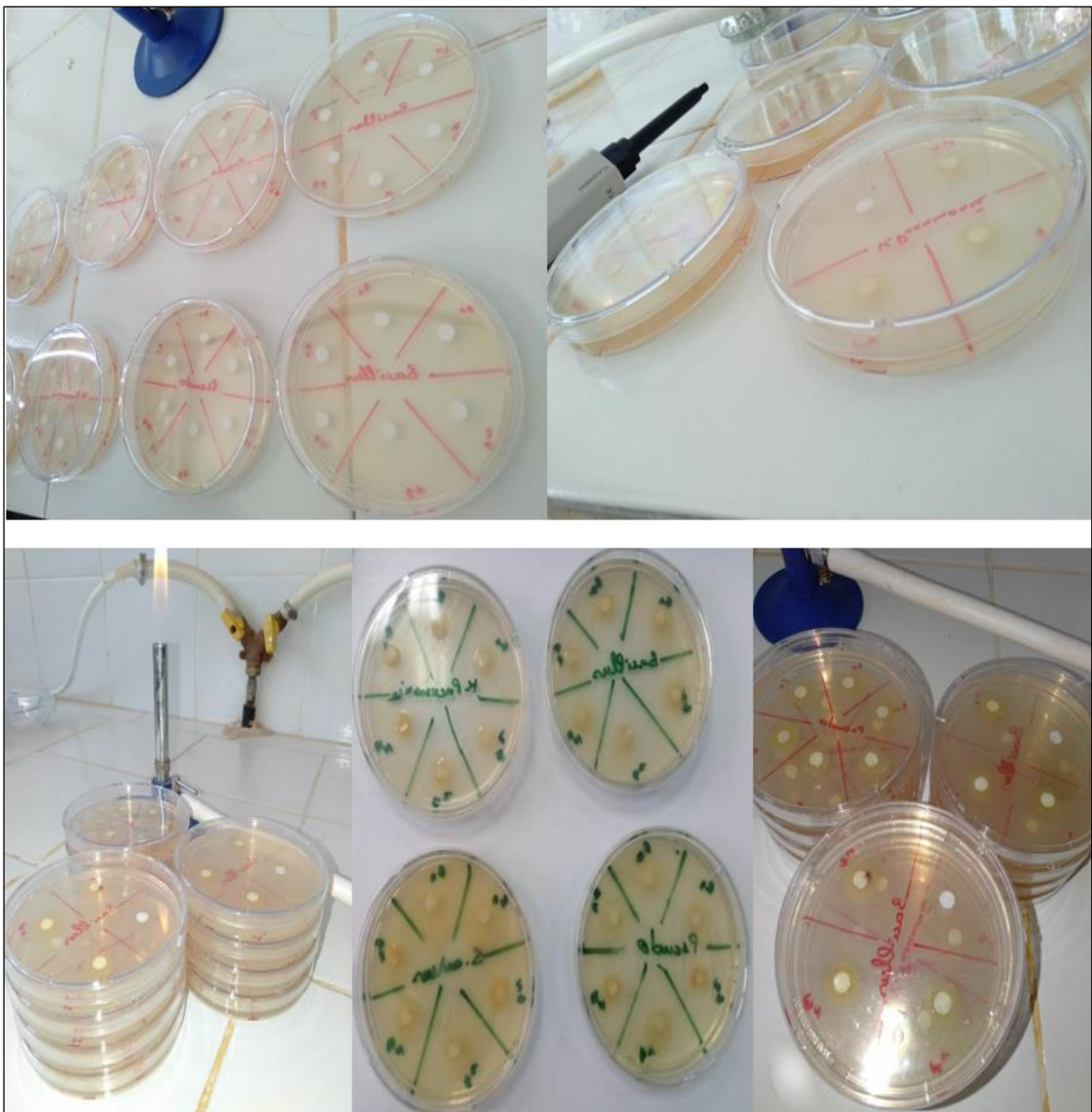


Figure 29 : Photos d'application des disques au niveau de boîtes de Pétrie (**Photo personnelle**).

E. Lecture

Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) ont été mesurés autour des disques après une pré-incubation de 30 minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24. Les expériences ont été réalisées en trois répétitions. Le diamètre est mesuré en incluant le diamètre du disque à l'aide d'une règle (figure 30).

La souche ayant une zone d'inhibition un de diamètre $D < 8$ mm, $9 \leq D \leq 14$ mm, $15 \leq D \leq 19$ mm, $D > 20$ mm est considérée respectivement comme souche résistante (non sensible) (-), sensible (+), très sensible (++), extrêmement sensibles (+++).

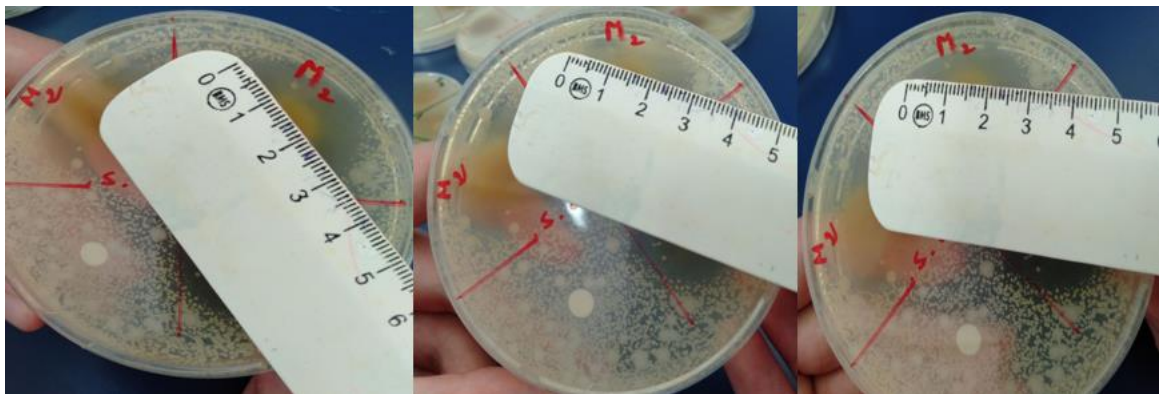


Figure 30 : Mesure de diamètres des zones d'inhibition (**Photo personnelle**).

II.8. Etude statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm Ecart-type, où une analyse des données a été menée à travers le test t de Student, le principe consistant à comparer les différents extraits par rapport à l'EMPG selon le logiciel MINITAB (Version 13.31). Les différences s'expriment comme suit :

- ✓ Significatives : lorsque ($P \leq 0,05$).
- ✓ Hautement significatives : lorsque ($P \leq 0,01$).
- ✓ Très hautement significatives : lorsque ($P \leq 0,001$).

Chapitre II : Résultats et discussion



I. Etude phytochimique

I.1. Rendements des extraits

Trois extraits méthanolique, éthanolique et buthanolique ont été préparés à partir d'écorce de *Punica granatum L.* (EMPG, EEPG, EBPG). La macération pendant 24 heures de l'écorce de *Punica granatum L.* a donné les rendements montrés dans le tableau 05 :

Tableau 05 : Le rendement de trois extraits de l'écorce de *Punica granatum L.*

Les extraits	Le poids du matériel végétal en (g)	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
EMPG	40	14.92	37.32
EEPG	40	12.67	31.66
EBPG	40	3.81	9.52

Les rendements représentés dans le tableau ci-dessus sont illustrés sous forme d'un histogramme permettant de faire une comparaison entre les rendements des trois extraits de l'écorces de *Punica granatum L.* (Figure 31) :

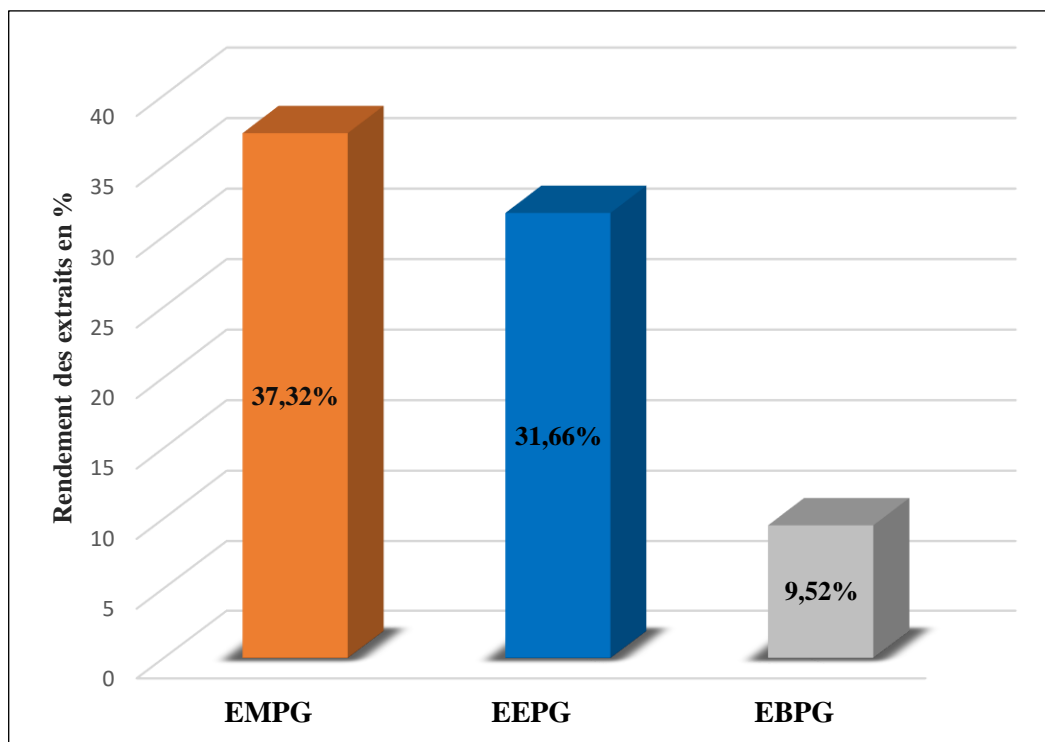


Figure 31 : Rendements des extraits de l'écorce de *Punica granatum L.*

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. Les solutions hydroalcooliques sont généralement utilisées pour l'extraction (**Bouchiba et al., 2020**). L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction.

Les résultats d'extraction obtenus lors de cette étude montrent que les meilleurs rendements sont obtenus par l'EMPG avec 37.32% et EEPG avec 31.66%, par rapport de l'EBPG qui représente 9.52 %.

Étant donné que les performances étaient relativement élevées et que les méthodes d'extraction des extraits sont similaires, nous expliquons la différence de rendement par les différents solvants utilisés, c'est-à-dire la nature du solvant en termes de la nature chimique du composé, de sa polarité, de ses propriétés physico-chimiques. Le solvant organique (méthanol 80% = extraction méthanolique) est considéré comme le plus efficace pour obtenir un meilleur rendement.

De plus **Thongson et al., (2008)** ont montré que l'éthanol et méthanol sont les meilleurs solvants d'extraction, permettant ainsi d'obtenir un rendement élevé avec la préservation maximale de la structure chimique des molécules bioactives. Ces mêmes auteurs, ont montré également que l'extraction par ultrasons augmente généralement l'efficacité de l'extraction.

Des rendements supérieurs ont été trouvés dans l'étude menée par **Bouchiba et al., (2020)**, avec un pourcentage de l'ordre de 42% de l'EMPG et 39% de l'EEPG obtenus à partir l'écorce de la grenade récoltée. Cette différence entre les résultats de rendement des extraits d'une même plante est due aux choix du matériel, l'origine géographique de la plante, les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, le contenu de chaque espèce en métabolites, de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (**Nsemi, 2010**).

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

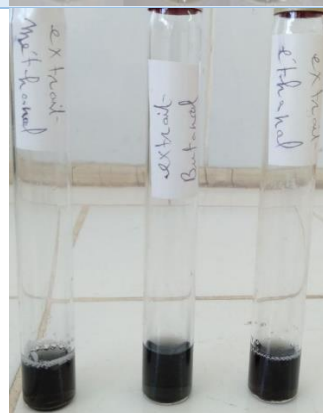
I.2. Tests phytochimiques

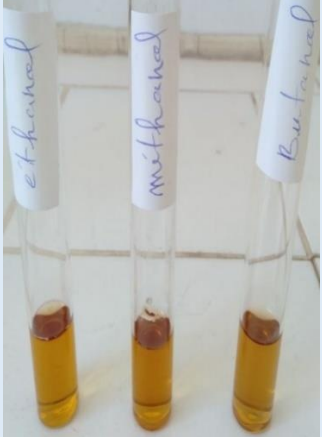
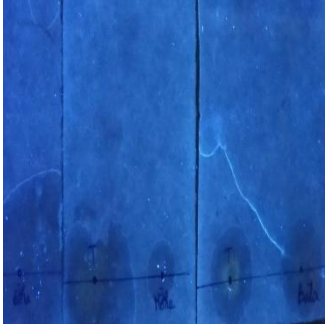

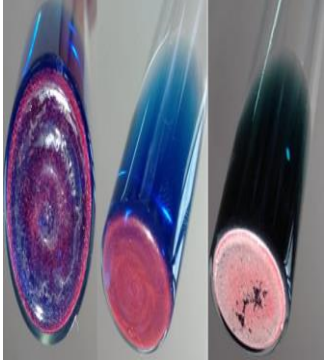
Ces tests ont été utilisés dans le but de mettre en évidence la présence de différentes familles des métabolites secondaires dans l'écorce *Punica granatum L.*, qui peuvent être responsables des activités biologiques. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation, un changement de couleur ou

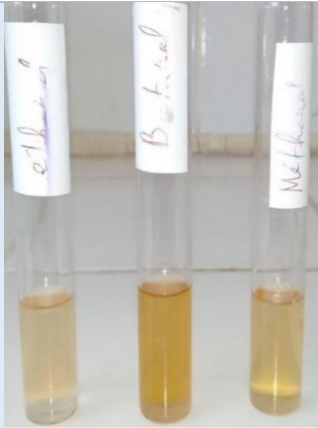

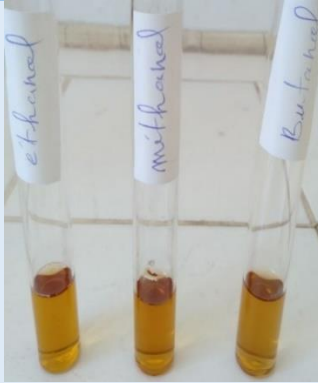
un examen sous la lumière ultraviolette. Les résultats de l'analyse phytochimique des trois extraits étudiés sont présentés dans le tableau 06 :

Tableau 06 : Résultats des tests phytochimiques sur les trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG).

Métabolites secondaires	Les extraits			Observations
	EMPG	EEPG	EBPG	
Flavonoïdes	+++	+++	+++	L'apparition d'une couleur : EMPG : jaune très foncé EEPG : jaune foncé EBPG : jaune claire
Saponosides	+	+	++	Formation d'une mousse persistante après 15 min
Tanins	+++	+++	+++	Les trois extraits apparaissent en verdâtre



<p>Quinones libres</p>	<p>+++</p>	<p>+++</p>	<p>+++</p>	<p>Les trois extraits apparaissent en jaune foncé</p>	
<p>Coumarines</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Absence d'une fluorescence intense</p>	
<p>Stérols et Triterpènes</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Absence d'une couleur mauve, verte ou violette</p>	
<p>Composés réducteurs</p>	<p>+++</p>	<p>++</p>	<p>+++</p>	<p>L'apparition d'un précipité rouge-brique</p>	

Terpénoïdes	+	+	++	L'apparition de couleur brune dans l'interphase des trois extraits.	
Alcaloïdes	-	-	-	L'absence de l'apparition d'un précipité blanc ou brun dans les trois extraits.	
Anthraquinone	-	-	-	Absence de la couleur violette.	

Les résultats sont interprétés comme suit : (-) : test négatif ; (+) : test faiblement positif ; (++) : test positif ; (+++) : test fortement positif.

Ces tests phytochimiques facilitent l'estimation quantitative des composés chimiques pharmacologiquement actifs. Le dépistage dans cette présente étude a révélé la présence de la majorité de métabolites secondaire. Les flavonoïdes et les tanins sont présents en forte quantité dans les trois extraits des écorces de *punica granatum L.* Les résultats de l'analyse des flavonoïdes et tanins effectuée par **Meziane (2018)** correspondent à nos résultats obtenus. Les flavonoïdes et les tanins sont des composés phénoliques qui constituent un groupe majeur qui agissent comme antioxydants primaires ou piègeurs de radicaux libres.

Ces composés se sont avérés présents dans les extraits et pourrait être responsable de la capacité antioxydante de ces extraits de l'écorce de grenade. Les flavonoïdes sont également responsables de l'inhibition des microbes résistants aux éventuellement. Ils sont responsables des processus de balayage et peuvent également perturber les membranes microbiennes.

Le test est positif pour détecter la mousse de saponines, qui sont bien présentes dans tous les extraits, d'une taille d'environ 1 cm dans l'extrait EBPG, et d'environ 0,8 dans les extraits EMPG et EEPG. D'après les travaux de **Douaouri (2018)**, ont donné un résultat positif où la mousse de saponines était d'environ 0,7 cm pour l'EMPG et EEPG. Nous pouvons interpréter notre obtention de meilleurs résultats par la méthode d'analyse phytochimique utilisée. Nos résultats montrent aussi une forte présence de quinones libres et les composés réducteurs dans les trois extraits (EMPG, EEPG et EBPG). La présence des terpénoïdes est plus forte dans l'EBPG que dans l'EMPG et EEPG.

Les analyses qualitatives indiquent l'absence des Coumarines, l'antraquinone, alcaloïdes, Stéroïdes et Triterpènes.

Donc La composition chimique d'un végétal varie selon les espèces et au sein même d'une espèce. Elle dépend des conditions de culture (qualité du sol, climat, irrigation, traitements phytosanitaires), et de la période de récolte (précoce ou tardive).

I.3. Résultats de l'étude qualitative par CCM

Pour tester l'analyse qualitative de la teneur en métabolites des trois extraits de l'écorce de *Punica granatum L.*, la chromatographie sur couche mince (CCM) a été adoptée car elle est considérée comme l'une des méthodes habituelles de séparation et de purification des différents composants. L'identification des composés a été basée sur la comparaison des R_f et des couleurs observés sous lampe UV des taches apparus sur CCM. Les résultats sont illustrés dans le tableau 07 et les figures 32 et 33.

Nous avons réalisé la séparation de l'extrait EMPG, EEPG et EBPG avec les systèmes de solvants suivants :

- ✓ **Système 1** : Ethyle acétate/acide formique/AAG / eau (25 : 3 : 3 : 7 v/v).
- ✓ **Système 2** : n-butanol/eau/acide acétique glacial (4 : 5 : 1 v/v).
- ✓ **Système 3** : Chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau (16 : 8 : 3 : 2 v/v).

Tableau 07 : Résultats de la CCM des des trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG) par différents systèmes de solvant.

Système	Extraits	Spots	Couleur sous UV 254 (nm)	Couleur sous UV 366 (nm)	Constituants possibles	Rf (cm)
1	EMPG	2	Marron foncé	Jaune vert	Flavonoïdes	0,77
	EEPG	2	Marron foncé	Jaune vert	Flavonoïdes	0,86
	EBPG	2	Marron foncé	Jaune vert	Flavonoïdes	0,90
2	EMPG	1	Marron clair	Bleu	Tanins	0,92
	EEPG	1	Marron clair	Bleu	Tanins	0,90
	EBPG	1	Marron clair	Jaune vert	Flavonoïdes	0,91
3	EMPG	1	Marron clair	Bleu blanc	Flavonoïdes	0,73
	EEPG	1	Marron clair	Bleu blanc	Flavonoïdes	0,76
	EBPG	1	Marron clair	Bleu blanc	Flavonoïdes	0,75

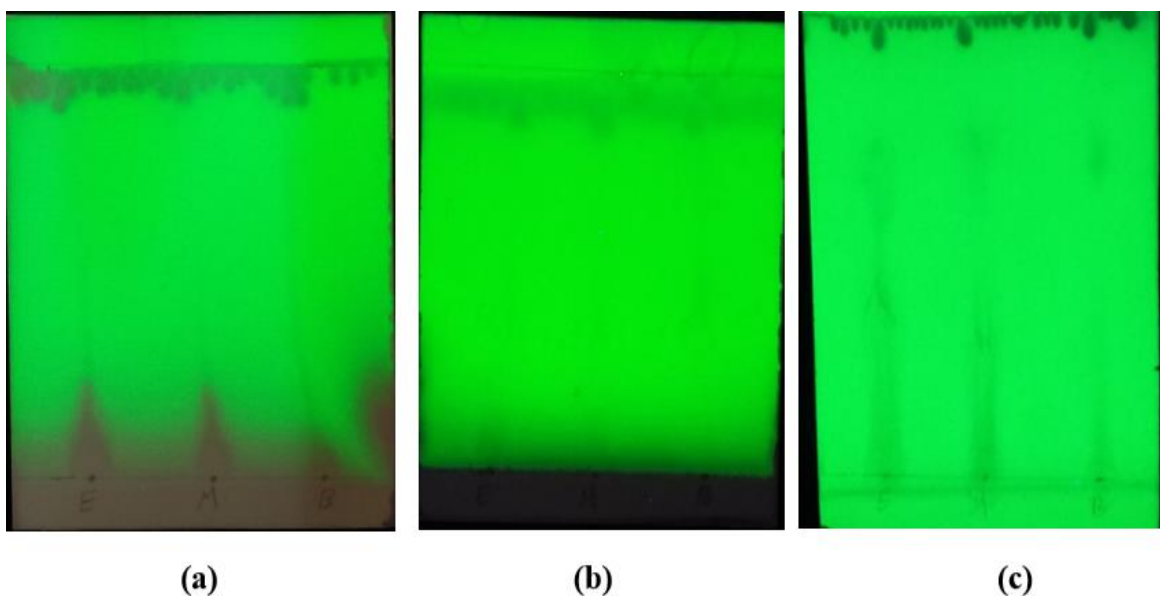


Figure 32 : Photos de chromatogramme résultant de l'analyse des trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG) par CCM sur gel de silice par le système de solvant 1 : (a) à 254 nm, système de solvant 2 : (b) à 254 nm, système de solvant 3 : (c) à 254 nm.

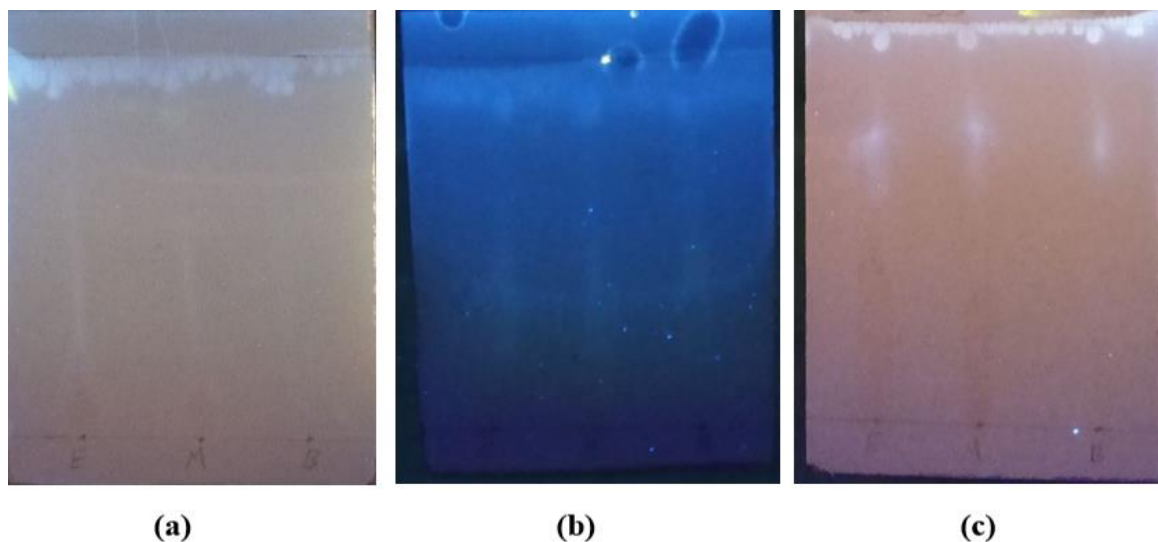


Figure 33 : Photos de chromatogramme résultant de l'analyse des trois extraits (EMPG, EEPG, EBPB) par CCM sur gel de silice par le système de solvant 1 : (a) à 365 nm, système de solvant 2 : (b) à 365 nm, système de solvant 3 : (c) à 365 nm.

Pour une caractérisation partielle des différents extraits de la plante *Punica granatum L.*, une chromatographie sur couches minces (CCM). Un ensemble des spots a été obtenu par les différents systèmes solvants utilisés ; avec deux spots par le système 1 pour les trois extraits (éthyle acétate/acide formique/AAG / eau (25 : 3 : 3 : 7 v/v), et 1 spot par le système 2 pour les trois extraits (n-butanol/eau/acide acétique glacial (4 : 5 : 1 v/v), également 1 spot pour le système 3 (Chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau (16 : 8 : 3 : 2 v/v). Après l'observation en lumière ultraviolette (254 et 365 nm), à 254 nm, la majorité des taches apparaissent de couleur marron foncé et marron clair dans les systèmes 1 et 2 et 3. A 366 nm, les taches apparaissent jaune verte et bleu dans les systèmes 1 et 2 mais dans le système 3 des taches apparaissent de couleur bleu blanc, tout ce nombre de taches hautes et de couleurs variées est une indication de la présence de plusieurs types de produits chimiques.

On peut justifier ces résultats par la polarité entre la phase liquide (solvants) et les solutés étudiés. Le mouvement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions qui existent entre le soluté, la phase mobile et la phase stationnaire. La CCM nous a permis de contrôler la qualité de nos extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis. Elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits (coloration et facteurs de rétention).

Selon **Belfekih et al. (2017)**, le marron peut indiquer à la présence des flavonoïdes, et le bleu blanc à la présence des tanins.

I.4. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des différents extraits obtenus à partir des écorces de fruit de *Punica granatum L.*, a été estimée par des dosages spectrophotométriques, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La raison principale pour le choix des polyphénols totaux réside dans leurs propriétés antioxydantes plus importantes (**Bakhtaoui, 2007**), ainsi qu'à leur large utilisation en phytothérapie (**Hennebelle et al., 2004**). L'analyse quantitative des polyphénols totaux est déterminée à partir d'équation de la régression linéaire ($y = 0.0113x + 0.0686$) et le coefficient de corrélation ($R^2 = 0,9984$) de courbe d'étalonnage exprimée en μg équivalent acide gallique par mg d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$) (Figure 34). Les résultats sont illustrés dans le tableau 08 et la figure 35.

Tableau 08 : Teneur en polyphénols dans les trois extraits (EMPG, EEPG, EBPG).

Les extraits	Polyphénols totaux ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$)
EMPG	43,398 \pm 0,375
EEPG	52,469 \pm 3,191*
EBPG	17,159 \pm 1,564*

*Significative / ** hautement significative / *** très hautement significative

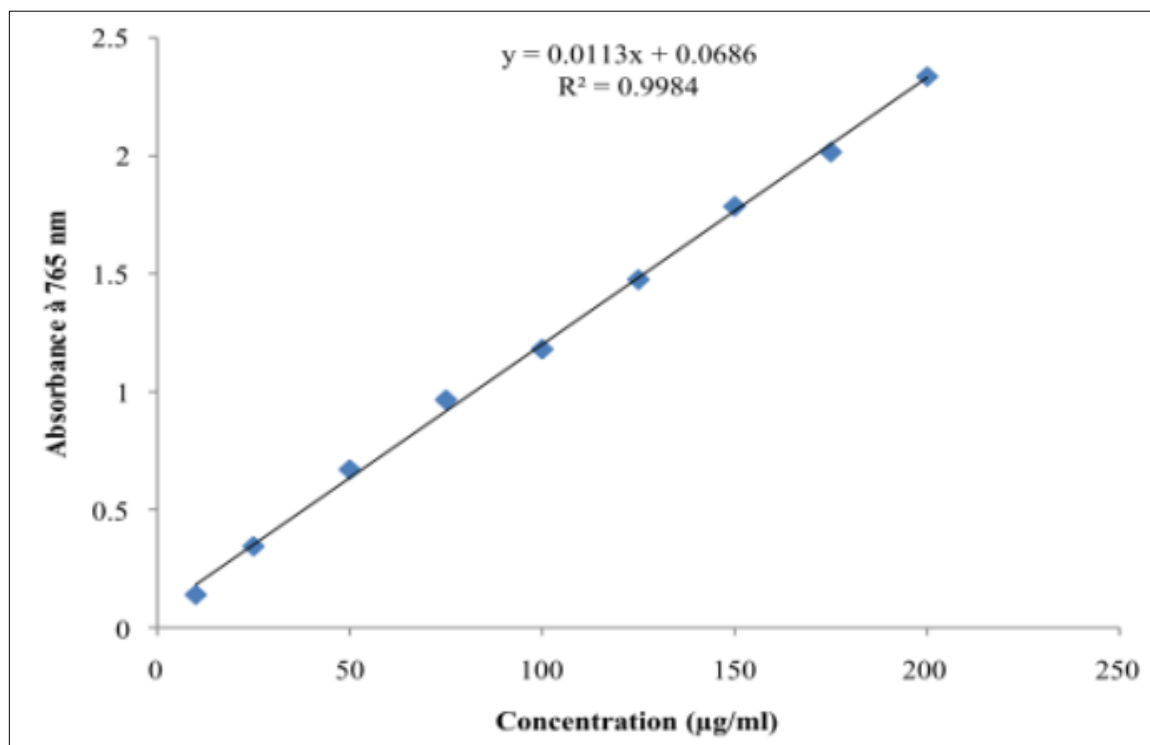


Figure 34 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Dakhouche et al., 2022**).

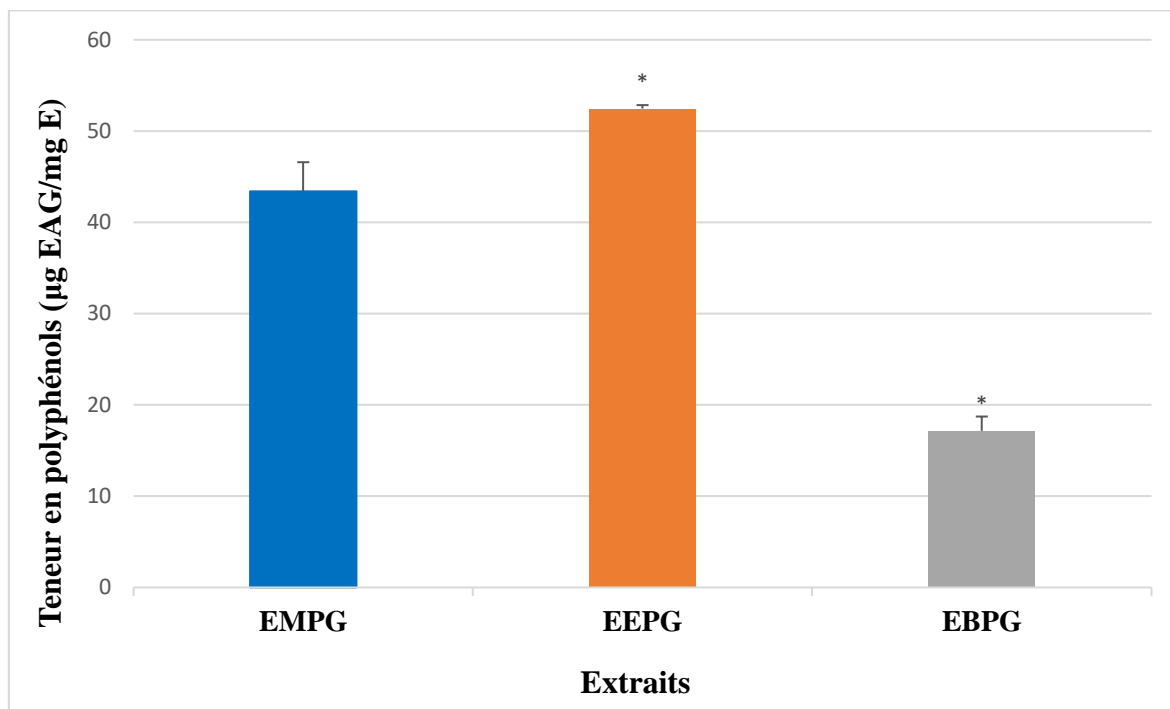


Figure 35 : Teneur en polyphénols totaux (µg EAG/mg E).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent la richesse de l'EEPG en composés phénoliques totaux avec un taux estimé à $52,469 \pm 3,191$ µg EQ/mg. De même, l'EMPG a également montré un contenu élevé, suivie de l'EBPG, soit des teneurs de l'ordre de $43,398 \pm 0,3754$ µg EQ/mg et $17,159 \pm 1,564$ µg EQ/mg, respectivement.

La diversité structurale des composés phénoliques est responsable de la grande variabilité des propriétés physicochimiques influençant l'extraction des polyphénols (Koffi *et al.*, 2010). Entre autres, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé (Garcia-Salas *et al.*, 2010 ; Jokic *et al.*, 2010). Alors les différences teneurs en polyphénols totaux obtenus peuvent être attribuées aux différences de composition qualitative et quantitative en polyphénols totaux. Toutefois il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques tels que des facteurs géographiques, climatiques et les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation du plant et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Fiorucci, 2006).

I.5. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de faible masse moléculaire produits par les plantes. Ils appartiennent à la classe des composés phénoliques et présentent une activité antioxydante élevée (Meziane, 2018).

L'EMPG, l'EEPG et l'EBPG ont été étudiés quantitativement par spectrophotométrie, et la teneur totale en flavonoïdes a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium. Une courbe d'étalonnage a été tracée pour cette cible (Figure 36) établie avec différentes concentrations de quercétine. Les mesures de densité optique de chaque extrait ont été effectuées à 448 nm. Les quantités de flavonoïdes correspondants sont rapportées en équivalents de quercétine par milligramme de la matière végétale sèche ($\mu\text{g EQ}/\text{mg E}$). Les résultats sont illustrés dans le tableau 09 et la figure 37. La principale raison pour laquelle nous avons choisi cette classe de polyphénols est que les flavonoïdes sont les composés les plus nombreux parmi tous des composés phénoliques (Emeraux, 2019). Il existe environ 6 500 flavonoïdes divisé en 12 catégories et leur nombre ne cesse d'augmenter (Muanda, 2010).

Tableau 09 : Teneur en flavonoïdes dans les trois extraits (EMPG, EEGP, EBPG).

Les extraits	Flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ}/\text{mg d'extract}$)
EMPG	32,7292 \pm 0,3427**
EEPG	28,3384 \pm 0,1550
EBPG	28,0507 \pm 0,0507**

*Significative / ** hautement significative / *** très hautement significative

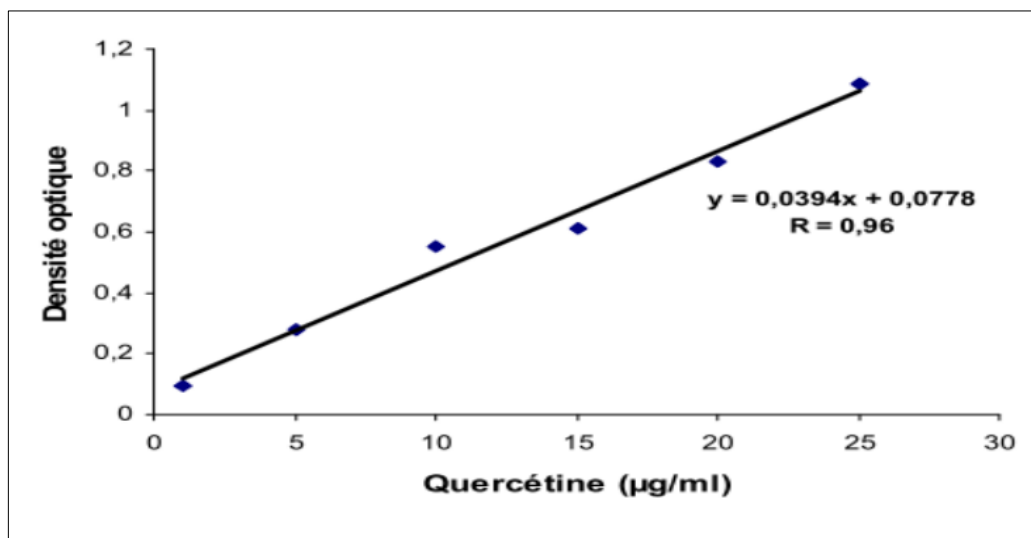


Figure 36 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (Dakhouche *et al.*, 2022).

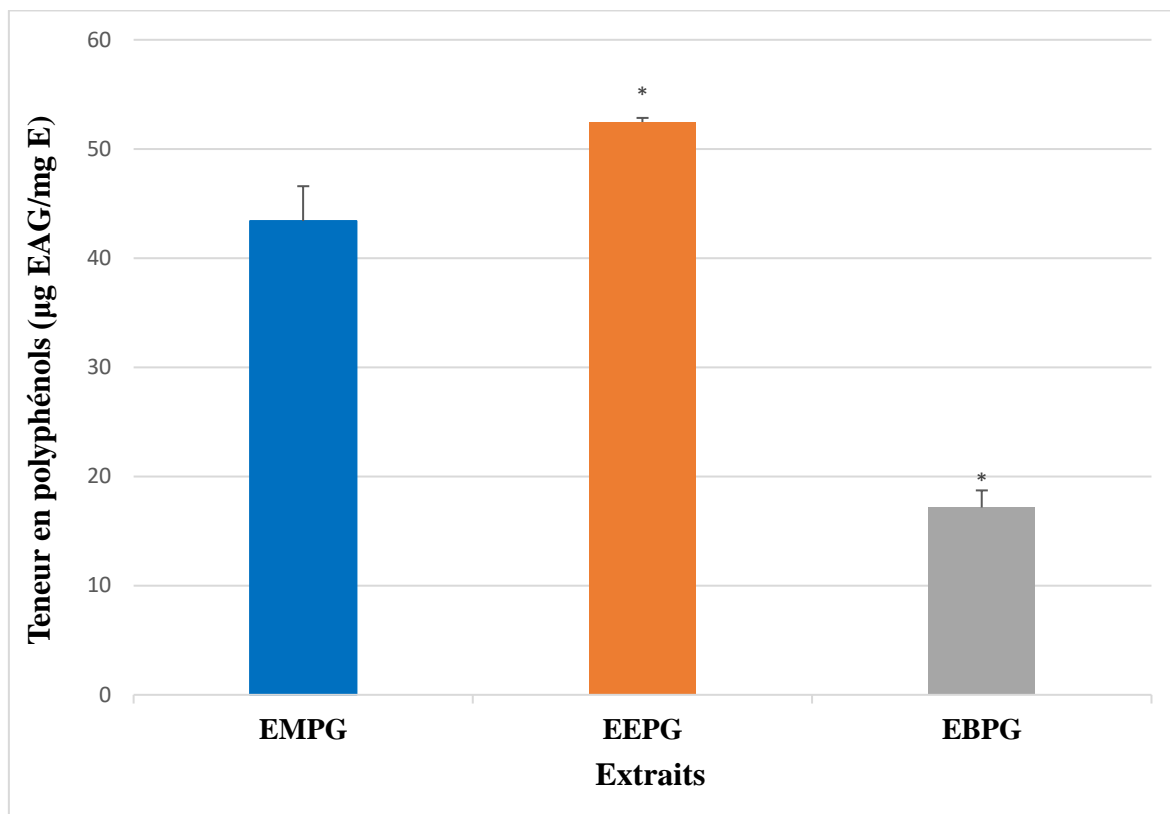


Figure 37 : Teneur en flavonoïdes totaux (µg EQ/mg E).

Nous avons effectué le dosage des flavonoïdes qui constituent une partie intégrante des polyphénols totaux. Il ressort de ces résultats (Figure 37) que les flavonoïdes sont plus abondants dans l'EMPG avec une teneur de $32,72 \pm 0,34$ µg EQ/mg que dans l'EEPG qui possède une teneur de $28,33 \pm 0,15$ µg EQ/mg, et l'EBPG qui possède une teneur de $28,05 \pm 0,05$ µg EQ/mg. EEPG et EBPG contenaient presque la même valeur.

Meziane (2018), ont rapporté que les flavonoïdes représentent seulement une petite partie des polyphénols présents dans l'extrait d'écorces de grenade. Ce fruit contient plusieurs molécules de flavonoïdes, constituant près de 0,2 à 1,0 % du poids du fruit. Environ 30 % de toutes les anthocyanidines de fruits sont concentrées dans l'écorce du fruit. La variation de teneurs en flavonoïdes entre les trois extraits dépend du type de solvant utilisé et la polarité de chaque solvant. La variation de teneurs en flavonoïdes entre les trois extraits dépend du type de solvant utilisé et la polarité de chaque solvant.

Cependant, il existe plusieurs études menées sur le même type de plante, et l'une d'entre elles est l'étude menée par **Benslimane (2021)**, où il a été démontré de faibles pourcentages de teneur en flavonoïdes pour les extraits EMPG et EEPG avec des teneurs de : $22,49 \pm 0,34$ µg EQ/mg E, $14,09 \pm 0,8$ µg EQ/mg E, respectivement. Et l'étude menée par **Redha et al. (2018)**,

où il a été démontré de élevés de teneur en flavonoïdes des extraits EMPG et EEPG avec des teneurs : $44.82 \pm 1.25 \mu\text{g EQ/mg E}$, $31.78 \pm 3.49 \mu\text{g EQ/mg E}$, respectivement.

Nos résultats sont en bon accord avec les études précédentes, montrant que l'EMPG a donné la teneur maximale en flavonoïdes totaux par rapport aux autres extraits.

De nombreux chercheurs confirment que les variations obtenues sur les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes totaux sont attribuées au procédé d'extraction et les facteurs géographique et climatique, ainsi que La nature de solvant d'extraction utilisé. De même, d'autres justifient les variations dans les contenus de ces métabolites secondaires à la différence observée sur la polarité des solvants (**Bdoudjenah et Merzouge, 2015**).

II. Evaluation in vitro des activités biologiques

II.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'EMPG, EEPG et EBPG vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. En faisant varier la concentration de l'extrait et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI %). Les résultats sont illustrés dans le tableau 10 et la figure 38.

Tableau 10 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les trois extraits de *Punica granatum L.*

Concentration en (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition (PI%)		
	EMPG	EEPG	EBPG
0,1 (mg/ml)	65,07±0,41	50,94±0,39	51,09±0,47
0,3 (mg/ml)	73,70±0,41	52,51±0,27	67,18±0,48
0,5 (mg/ml)	81,39±0,20	53,29±0,35	73,23±0,39
0,7 (mg/ml)	88,77±0,41	78,41±0,43	84,14±0,35
1 (mg/ml)	92,46±0,43	90,97±0,47	86,49±0,55

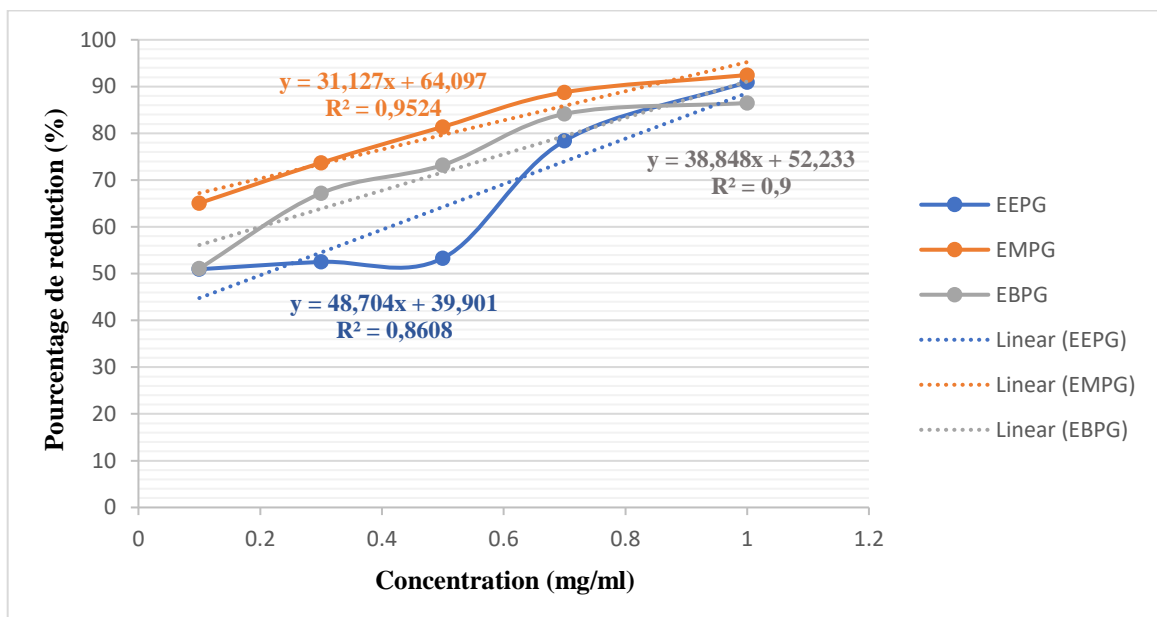


Figure 38 : Courbe présentant les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des trois l'extraits (EMPG, EEGP, EBPG).

Les résultats de l'activité antioxydante obtenue révèle une augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) en fonction des concentrations de l'extrait de *Punica granatum L.* A la plus faible concentration (0,1 mg/ml), l'extrait EMPG a présenté un PI de 65,07 %, par contre l'extrait EEGP a présenté un PI de 50,94 % et l'extrait EBPG a présenté un PI de 51,09 % ; tandis qu'à la plus grande concentration (1 mg/ml) de même extrait le PI a atteint 92,46 % pour l'extrait EMPG et 90,97 % pour l'extrait EEGP, et 86,49 % pour l'extrait EBPG.

Ceci montre que l'espèce *Punica granatum L.* possède un très grand potentiel antioxydant. D'après les résultats illustrés dans la figure 38, nous avons remarqué que l'EMPG montrent un grand pouvoir réducteur en comparaison avec ceux de l'EEGP et EBPG même avec des faibles concentrations.

En générale, le potentiel réducteur des extraits végétaux est dû à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables, parmi lesquelles les polyphénols (Bouhewem, 2022).

Les résultats de cette expérience obtenus révèlent que les extraits de l'écorce de ce fruit possèdent une activité antioxydante importante, qu'on attribue à ses richesses en composés phénoliques. En effet les travaux réalisés par Bakhtaoui (2019) ont suggéré que les molécules polaires polyphénoliques présentes dans l'extrait végétal contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire, et ceux de David *et al.* (2006) ont démontré que l'écorce de *Punica granatum L.*, possèdent des propriétés antioxydantes très importantes.

(Negi et Jayaprakasha. 2003) ont aussi rapporté que l'extrait d'écorces de la grenade présente une forte activité antioxydante. Selon Bhat *et al.* (2014), la récupération des polyphénols et d'autres composés antioxydants de la matière végétale dépend considérablement, de la solubilité de ces composés dans un solvant donné, de la polarité des solvants et de la viscosité. Ainsi, les solvants tels que le méthanol peuvent atteindre facilement les endroits intracellulaires, afin de lixivier au maximum les constituants actifs.

II.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Afin de réaliser cette expérience, nous avons évalué in vitro le pouvoir antibactérien de trois (3) extraits (EMPG, EEPG et EBPG), de l'écorce de *Punica granatum L.* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton). L'activité antibactérienne de nos extraits est estimée en termes de diamètre de zone d'inhibition (mm) autour des disques contenant l'extrait à tester contre quatre (4) germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*) après 18 à 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37° C. Les valeurs indiquées sont les moyennes des trois mesures de diamètres du même essaie.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus sont représentés dans le tableau 11 et les figures 39-42. Les résultats du test de diffusion sur disque ont indiqué que les trois extraits hydro- alcoolique (EMPG, EEPG et EBPG) de l'écorce de *Punica granatum L.* présentaient différents degrés d'inhibition de la croissance, selon les souches bactériennes.

Tableau 11 : Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne.

Souches bactériennes	Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne (mm)					
	200 mg/ml			300 mg/ml		
	EMPG	EEPG	EBPG	EMPG	EEPG	EBPG
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,33±1,52	18,66±0,57*	12±1**	31,66±1,52	19,33±0,57*	15,66±1,15*
<i>Bacillus Subtilis</i>	21±1,73	9,33±0,57	14,66±1,15*	21,66±1,52	10,66±0,57	17,66±1,15*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,33±0,57	11±0*	12,66±1,15**	14,33±0,57	11,33±1	15±0**
<i>Klebsiella pneumonia</i>	14,33±0,57	11±1***	11,33±1,15*	20±1	11,33±0,57	12,66±1,52**

*Significative / ** hautement significative / *** très hautement significative

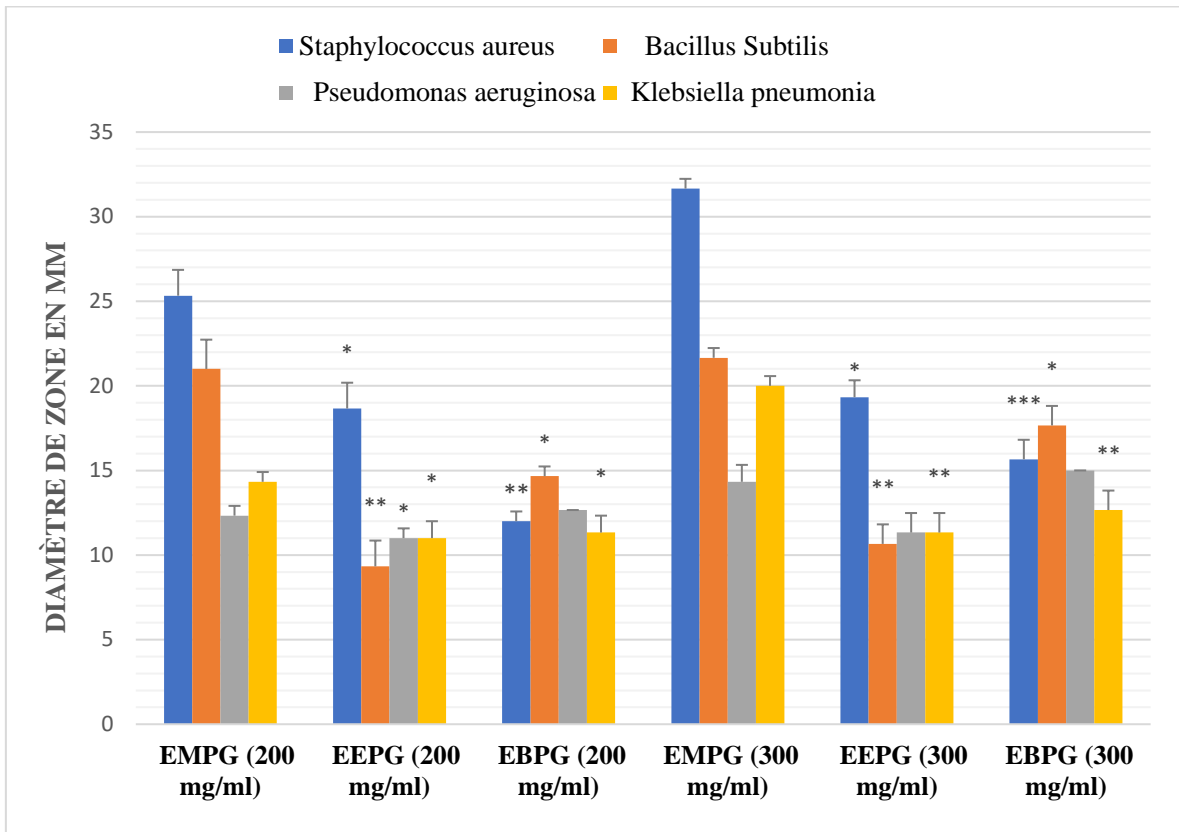


Figure 39 : Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents extraits.

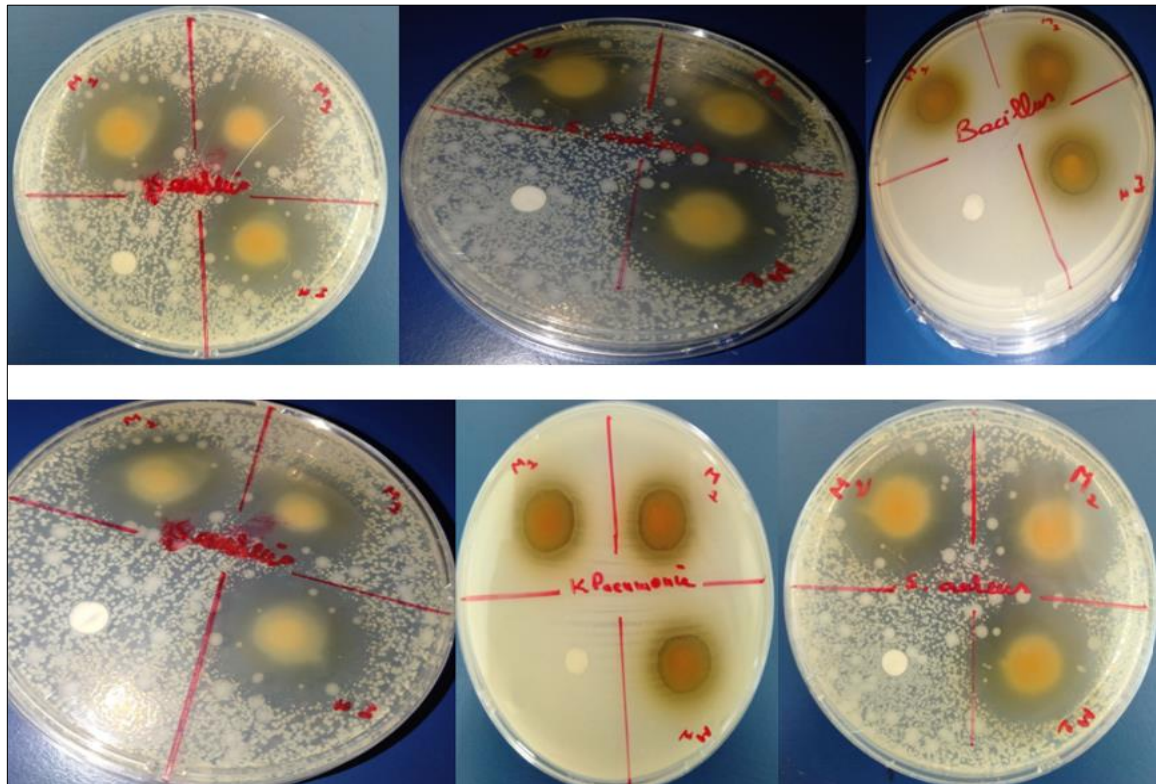


Figure 40 : Résultats de l'activité antibactérienne de EMPG.

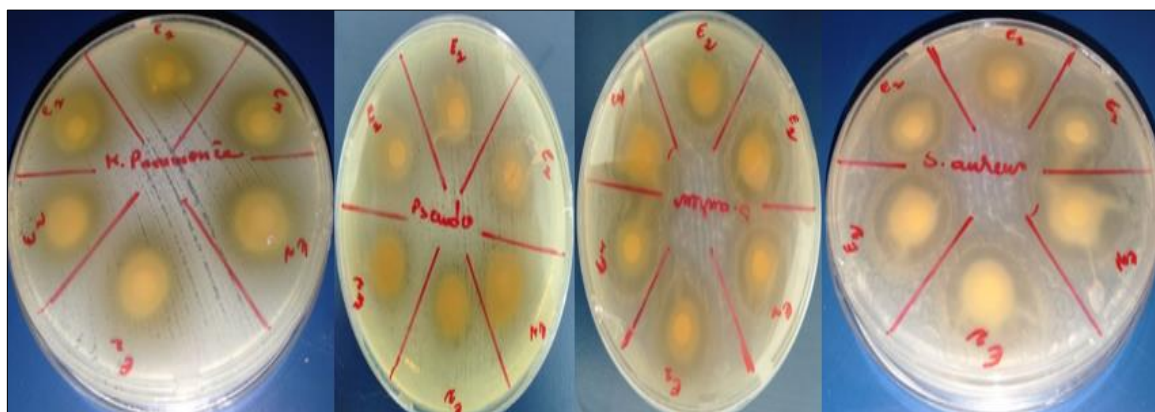


Figure 41 : Résultats de l'activité antibactérienne de EEPG.



Figure 42 : Résultats de l'activité antibactérienne de EBPG.

Les résultats de l'étude montrent que l'écorce de *Punica granatum L.* possède une activité antibactérienne assez importante contre les bactéries Gram-positif et Gram-négatif. L'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition est directement liée au type de solvant utilisé pour chaque extrait. Il a été mentionné par **Naziri et al. (2012)**, que l'utilisation de différents solvants pour l'extraction peut modifier les degrés d'effet antibactérien des extraits, car les substances antimicrobiennes actives peuvent avoir une solubilité différente dans différents solvants.

A la lumière de ces résultats, il est à noter que les trois extraits de l'écorce de la grenade ont agi de manière directement proportionnelle avec la concentration utilisée sur l'ensemble des bactéries testées. Les diamètres d'inhibition obtenus se trouvent entre 9,33 à 31,66 mm.

- La plus grande zone d'inhibition est celle de l'EMPG avec 31,66 mm de diamètre envers la souche bactérienne (Gram +) *Staphylococcus aureus*.

- La plus petite zone d'inhibition a été observée envers *Bacillus Subtilis* pour l'EEPG avec 9.33 mm.

Un effet dose dépendance a été noté ; les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration de l'extrait appliquée. Dans une autre étude menée par **Bdoudjenah et Merzouge, (2016)**, en travaillant sur l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de l'écorce de la grenade, les résultats montrent que l'activité inhibitrice des germes commence à partir d'une concentration de 50 mg/ml.

L'analyse des données montrent une différence de sensibilité. En effet, la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* a présenté une sensibilité plus élevée, comparativement aux autres souches, enregistrant par conséquent des zones d'inhibition de 25,33 mm et 31,66 mm lorsqu'elle a été traitée avec l'EMPG), et des zones d'inhibition de 18,66 mm et 19,33 mm lorsqu'elle a été traitée avec l'EMPG. Dans les mêmes conditions, la souche *Bacillus Subtilis* a également montré une sensibilité vis-à-vis de l'EMPG, mais avec des zones d'inhibition légèrement inférieures à celles enregistrées précédemment (21 et 21,66mm). Alors que *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumonia* à Gram-positif ont enregistré des zones d'inhibition allant de (12,33 à 20 mm). Il est à noter que l'EBPG, a agi de manière directement proportionnelle avec la concentration utilisée sur l'ensemble des bactéries testée. Il a montré une zone d'inhibition avec un diamètre allant de 11,33 à 17,66 mm. Dans une autre étude réalisée par **Chebaibi et al. (2011)**, il a été constaté que les extraits des écorce du grenade sont dotés d'une activité inhibitrice de la croissance bactérienne. Les diamètres des zones d'inhibitions varient entre 9,5 et 23,7 mm, selon la saison de la récolte et la méthode de préparation des extraits. Ses résultats sont difficilement comparables que les méthodes utilisées sont différentes, le choix de protocole d'extraction et plus particulièrement celui du solvant est très important (**Mirad, 2013**). De plus **Essawi et srour, (2000)**, indiquent que la variation de la composition chimique explique les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes. L'efficacité optimal d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait. Ainsi, **Bouchiba et al. (2020)** affirme que les réponses variables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes sont en fonction des souches, de la concentration et de type de l'extrait testé.

L'essai biologique de diffusion sur disque a montré que une sensibilité plus importante est observée chez les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatives. La raison de la différence de sensibilité entre les bactéries Gram positives et Gram négatives pourrait être attribuée aux différences morphologiques entre ces micro-organismes. Les bactéries Gram négatives ont une membrane phospholipidique externe portant les composants lipopolysaccharidiques structuraux. Cela rend la paroi cellulaire imperméable aux solutés lipophiles, tandis que les porines qui sont des protéines membranaires présentes dans la membrane externe des bactéries Gram-négatives, constituent une barrière sélective aux solutés hydrophiles avec une limite d'exclusion d'environ 600 Da (**Nikaido et Vaara, 1985**). Les bactéries Gram-positives devraient être plus sensibles puisqu'elles n'ont qu'une couche externe de peptidoglycane qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace (**Scherrer et Gerhardt, 1971**).

Sur la base des valeurs de la zone d'inhibition qui obtenues, le macérat hydro- alcoolique de la poudre de l'écorce de *Punica granatum L.*, s'est révélé être de puissants inhibiteurs contre toutes les souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Nikaido et Vaara, (2011)**. Ils ont découvert que l'écorce de *Punica granatum* devait avoir une activité antibactérienne in vitro. Ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur présenté par les extraits de la macération hydro-alcoolique de l'écorce de *Punica granatum L.*, pourrait être attribuable aux tanins qui représentent 28 % des constituants de l'écorce (**Lansky et Newman, 2007**). Cette famille de composés s'est avérée in vitro avoir diverses propriétés pharmacologiques telles que des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires (**Nikaido et Vaara, 2011**).

De plus, l'activité antibactérienne observée peut également être due à d'autres métabolites secondaires comme les composés phénoliques et les saponines qui étaient abondants dans cette plante. De manière générale, nous avons observé que l'EMPG était plus efficace que l'EEPG et EBPG.

Les résultats obtenus pourraient être considérés comme suffisants pour poursuivre les études en vue de l'isolement et de l'identification des principes actifs et pour l'évaluation d'une éventuelle synergie entre les composants de l'extrait pour leur activité antimicrobienne.

***Conclusion et
perspectives***

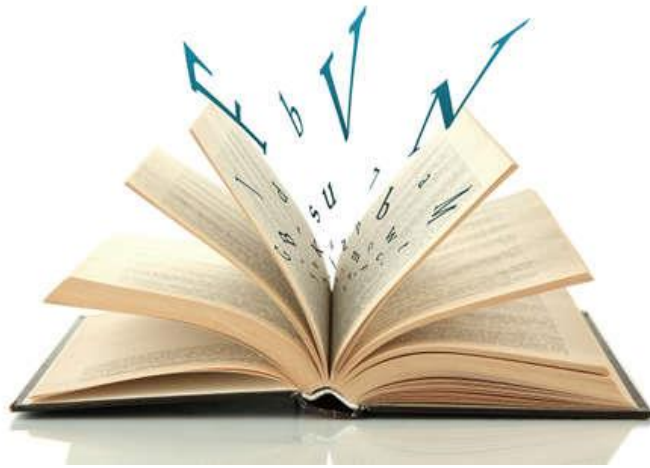
Conclusion et perspectives

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. *Punica granatum L.* est l'une de ces plantes, utilisée depuis longtemps à des fins thérapeutiques. Le présent travail avait pour but de faire une étude comparative entre les trois extraits, méthanolique, éthanolique et butanolique de l'écorce de *Punica granatum L.* de la région Chechar, Wilaya de Khenchela, qui a été testée pour sa composition chimique, et ses activités biologiques (antibactérienne et antioxydante) in vitro.

L'EMPG ayant un meilleur rendement par rapport à l'EEPG et EBPB. Les tests phytochimiques ont montré la présence de flavonoïdes, de tanins, de quinones libres, de saponines, de les composés réducteurs et de terpénoïdes et dans tous les extraits. Nos résultats ont également montré des résultats négatifs à la fois pour Coumarines, l'anthraquinone, alcaloïdes, Stéroïdes et Triterpènes. Les analyses qualitatives par chromatographie (CCM) ont révélé la présence des différentes classes flavonoïques susceptibles d'exprimer les activités recherchées. Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteau ont révélé que les concentrations les plus élevées de polyphénols ont été trouvées dans l'EEPG, et les dosages quantitatifs des flavonoïdes totaux par la méthode de d'AlCl₃ ont révélé que les concentrations les plus élevées de flavonoïdes ont été trouvées dans l'EMPG. Les résultats de l'activité antioxydante effectuée en utilisant la méthode de réduction des radicaux DDPH, ont indiqué que l'espèce *Punica granatum L.* possède un très grand potentiel antioxydant, avec la supériorité de l'EMPG par le pourcentage le plus élevé. Dans l'activité antibactérienne, l'écorce de la grenade a montré une activité remarquable sur quatre souches bactériennes étudiées, qui sont *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumonia*.

En fin, par ce travail nous espérons apporter notre modeste contribution à la valorisation des plantes médicinales Algériennes. Il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans nos fractions par l'HPLC et la RMN en vue d'identifier les principes actifs responsables des différentes activités biologiques de cette plante. L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités recherchées.

Références bibliographiques



Références bibliographiques

A

Achour S., Chebaibi M., Essabouni H., Bourhia M., Ouahmane L., Salamatullah A M., Aboul-Soud M A., Giesy JP., 2022. Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Used as Therapeutic Agents to Manage Diseases of Humans. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 8.

Amroune S E., 2018. Phytothérapie et plantes médicinales. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Option : Protection des Ecosystèmes. Université des Frères Mentouri Constantine, p. 66.

Ángel C S., Ángel A C., 2017. Jus de grenade cultivée en Espagne Punicalagine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade, dans l'alimentation fonctionnelle du futur. Université Miguel Hernández, p. 69.

Allegra S., De Francia S., Turco F., Bertaggia I., Chiara F., Armando T., Storto S., Mussa M V., 2023. Phytotherapy and Drugs: Can Their Interactions Increase Side Effects in Cancer Patients. *J Xenobiot*, 13(1), p. 75-89.

Arun N., Singh D P., 2012. Punica granatum: A review on pharmacological and therapeutic properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(5), p. 1240-1245.

Alkhatib M., Fayad C., Badran A., Hamade K., Daou A., Baydoun E., Hijazi A., 2022. Preventive and Therapeutic Effects of Punica granatum (Pomegranate) in Respiratory and Digestive Diseases: A Review. *Applied Sciences*, 12(23), p. 12326.

Aouachria S., 2022. Chromatographie. Cours de Master 1 en Biochimie structurale, métabolique et moléculaire. Université Batna 2, p. 23.

Antonot E., Marchal R., 1998. Chromatographie. Rapport de stage MAFPEN. Lycée Louis Vincent – METZ, p. 52.

B

Bouabibsa I., 2020. Extraction, Analyse et Evaluation de l'Activité Antibactérienne d'Extraits de Galactites Tomentosa. Mémoire Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie de l'Environnement. Ecole Nationale Polytechnique, p. 65.

Bayou S., Kerroum A., 2020. Le grenadier (*Punica granatum L.*) : Usage traditionnel, étude phytochimique et évolutions thérapeutiques récentes. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie Option : Chimie Pharmaceutique. Université Mohammed Seddik Ben Yahia – Jijel, p. 62.

Barends-Jones V., 2021. The economic contribution of South Africa's pomegranate industry. *Journal d'Alseberg*, 18(4), p. 57- 64.

Boumidouna A., Kouar A., 2019. Contribution à l'étude phytochimique (par chromatographie à couche mince : CCM), des activités antibactériennes et des activités antioxydantes de l'extrait des feuilles de myrte (*Myrtus Cummnis L.*) de la région du nord constantinoise. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Alimentaire Option : Agroalimentaire et Contrôle de Qualité. Université Ziane Achour - Djelfa, p. 97.

Boutaghane N., 2022. Les techniques Chromatographiques. Cours de Master en techniques d'Analyses. Université de Constantine, p. 49.

Braithwaite A., Smith F G., 1999. Chromatographic Methods 5ème édition Kluwer Academic Publishers. London, p. 571.

Boizot N., Charpentier J P., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *HAL (open science)*, p. 5.

Bouchiba S., Zaidi K., Meddah A., 2020. Contribution à l'étude des extraits de *Punica granatum* contre les bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologique Option : Biologie des Populations et des Organismes. Université M'hamed Bougara de Boumerdes, p. 83.

Bdoudjenah M., Merzouge L., 2016. Etude quantitative des polyphénols et le pouvoir antibactérien des extraits de l'écorce de fruit de grenadier (*Punica granatum L.*). Mémoire réalisé en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie Option : Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, p 61.

Berdoudi A., 2021. Evaluation des activités antifongique et antibactérienne des extraits de plantes des genres *Centaurea papposa* rouge et *Punica granatum L.* Mémoire réalisé en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie Option : Biochimie Appliquée, Université Frères Mentouri Constantine 1, p 123.

- Benslimane S., 2021.** Contribution à l'étude de l'effet des extraits bruts des écorces du fruit de *Punica granatum* et des graines de *Cuminum cyminum* contre les biofilms à l'origine des infections buccodentaires. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur 3ème cycle LMD en Sciences Biologiques. Option : Interactions Microorganismes, Hôtes et Environnements. Université de Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, p. 220.
- Bdoudjenah S., Merzouge y., 2016.** Etude quantitative des polyphénols et le pouvoir antibactérien des extraits de l'écorce de fruit de grenadier (*Punica granatum L.*). Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Option : Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, p. 95.
- Bouhewem M., 2022.** Étude des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de L'écorce de grenades. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Option : Biochimie Appliquée. Université Larbi ben Mhidi-ou El-Bouaghi, p. 98.
- Bhat R., Liong M., Abdorreza M N., Karim A A., 2014.** Evaluation of free radical scavenging activity and antioxydant potentiel of a few popular green leafy vegetables of malaysia. *Int.J. Food prop*, 16 (6), p. 1371-1379.
- Bakhtaoui H., 2019.** Effet des extraits phénoliques des écorces de grenade (*Punica granatum. L*) sur l'évolution des paramètres physicochimiques et microbiologiques d'un lait fermenté de type yaourt. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences agronomiques Option : Biotechnologies alimentaires. Université Abdelhamid Ben Badis-Mostaganem, p. 111.
- Belfekih F., El Yahyaoui O., Chleh M., Ould Abdellahi L., Sammama A., Lrhorfi L A., Bengueddou R., 2017.** Screening phytochimique d'*Arbutus unedo L.* *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 5(3), p. 237-245.
- Bourgou S., Serairi B R., Medini F., Ksouri R., 2016.** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 28(12), p. 1649-1655.
- Bendjersi F Z., 2017.** Etude de La composition chimique des extraits de *Laurus nobilis L.* Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en chimie organique Appliquée. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, p. 90.

Benariba N., Djaziri R W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W J., Sener A., 2013. Phytochemical screening and free radical scavenging activity of Citrullus colocynthis seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(1), p. 35-40.

C

Courric E., Brinvilier D., Couderc P., Alejandro P M., Vanessa M M., Sylvestre M., Pelage G H., Vaillant J., Rousteau A., Bejarano E., Gerardo C T., 2023. Medicinal Plants and Plant-Based Remedies in Grande-Terre: An Ethnopharmacological Approach. *Plants (Basel)*, 12(3), p. 654.

Charik S., Kadri y., 2020. Criblage phytochimique et extraction des huiles essentielles de l'espèce lavandula officinalis. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Science de la matière Option : Chimie Pharmaceutique. Université Mohamed Boudiaf - M'sila, p. 65.

Coronado-Reyes J., Cortés-Penagos C., González-Hernández J., 2022. Chemical composition and great applications to the fruit of the pomegranate (*Punica granatum*) : a review. *Food Science and Technology*, 42.

Cesbron M., 2020. Vers l'élaboration de surfaces modifiées par des monocouches organiques mixtes issues de la réduction de précurseurs diazonium. *HAL ((open science)*, p. 169.

Chebaibi A., Rhazi F., Filali A., Zerhouni M., 2011. Eff bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadie marocain (*Punica granatum.*) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques, *Phytothérapie*, 9(3), p. 158.

D

Dif M., Benchohra A., Abbes D., Nasrallah D., Gherabi A., 2022. Ethnobotanical Study of Medicinal Plants in The Lagarmi Zone (Wilaya of El Bayadh - Algeria, West). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 14(1), p. 165-174.

Debbab L., 2021. Le diabète de type 2 à l'île de la Réunion : un enjeu majeur de santé publique. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université d'Aix Marseille, p. 180.

Duman A D., Ozgen M., Dayisoylu 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), p. 1808-1817.

David H., Risa N S., Navindra P S., 2006. P Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine. 2ème édition. CRC Press. Boca Raton, p. 263

Douaouri N E., 2018. Contribution à une étude phytothérapeutique, antiinflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum L.*) – Etude in vivo. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme en Science Biologique de Docteur Option : Plantes Médicinales et Phytothérapie. Université Abd El Hamid Ibn Badis de Mostaganem, p. 203.

Dakhouche C., Ghozal A., Boutrid R., 2020 Contribution à l'étude des activités biologiques de différents extraits de la plante *Laurus nobilis L.* (laurier). Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques : Biochimie Appliquée. Université Abbes Laghrour de kenchela, p. 97.

E

Elodie W., 2009. La grenadier (*Punica granatum L.*) : Plante historiques évolutions thérapeutiques récentes. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Henri Poincare Nancy 1, p. 158.

Essawi T., Srour M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 70(3), p. 343-349.

Emeraux E., 2019. Propriétés biologiques des flavonoïdes : étude bibliographique et évaluation de l'activité antioxydante. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Lorraine, p. 85.

F

Formica J V., Regelson W., 1995. Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids. *Fd Chem. Toxic*, 33, p. 1061-1080.

Fouillaud M., Caro Y., Venkatachalam M., Grondin I., Dufossé L., 2017. Anthraquinones. *HAL ((open science)*, p. 43.

Ferhat S., Saadaoui R., 2022. Etude bibliographique du fruit de *Punica granatum*. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Option : Biochimie. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A, p. 69.

Faddladdeen A A., Ojaimi K A., 2019. Protective Effect of Pomegranate (*Punica granatum*) Extract against Diabetic Changes in Adult Male Rat Liver : Histological Study. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 7(4), p. 165-170.

Fiorucci S., 2006. Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Chimie. Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice (France), p. 213.

G

Geeta M., 2021. Medicinal Plants and Their Values. *Natural Resources : Exploration, Exploitation and Expectation*, p. 55-67.

Garcia-Salas P., Morales-Soto A. Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15(12), p. 8813- 8826.

H

Hmid., 2013. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade du Marocaine (*Punica granatum L.*) : caractérisation physicochimique, biochimiques et stabilité de leur jus frais. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Sciences agronomiques Option : Agroalimentaire. Cotutelle entre l'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal (Maroc), p. 178.

Heena J., Ashraf P M., Sheikh R A., Mudasir R., Mudasir A., Shabeer H., 2018. Physico-chemical and functional properties of pomegranate peel and seed powder. *The Pharma Innovation*, 7(4), p. 1127-1131.

Helle R., Ennault R., Lance C., 2004. Physiologie Végétale. 6ème édition. Dunod, p. 336.

Hopkins W G., Rambour S., Evrard C M., 2003. Physiologie Végétale. 2ème édition. Boeck Université. Bruxelles, p. 514.

Hammiche V., 1988. Systématique et morphologie botanique. Algérie : office des publications.

Hennebelle. T., Sahpaz. S., Bailleul., 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytotherapie*, 2(1), p. 36.

I

Iskounen T., Tadount S., 2018. L'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait de l'écorce et du jus de la grenade *Punica granatum* de Kabylie, variété Lahlou. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Option : Biochimie Appliquée. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, p. 95.

J

Jorite S., 2015. La phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université Bordeaux 2, p. 156.

Jesús Alberto C R., Consuelo De Jesús C P., Juan Carlos G H., 2022. Chemical composition and great applications to the fruit of the pomegranate (*Punica granatum*) : a review. *Food Science and Technology*, 42, p. 29420.

Jokić S., Velić D., Bilić M., Bucić-Kojić A., Plan inić M., Tomas S., 2010. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Scienc*, 28(3), p. 206- 212.

K

Kumari A., Dora J., Kumar A., Kumar A., 2012. Pomegranate (*Punica granatum*) – Overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1, p. 1218-1222.

Karray A., Krayem N., Saad H B., Sayari A., 2021. Spirulina platensis, *Punica granatum* peel, and moringa leaves extracts in cosmetic formulations: an integrated approach of in vitro biological activities and acceptability studies. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(7), p. 8802-8811.

Kadi H., Moussaoui A., Benmehdi H., Lazouni H A., Benayahia A., bouderba N., 2011. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Punica granatum L.* bark. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(10), p. 180-182.

Koffi E., T. Sea T., Y. Dodehe Y., Soro S., 2010. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 5(3), p. 550-558.

L

Limonier A S., 2021. La Phytothérapie de demain : les plantes médicinales au cœur de la pharmacie. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université d'Aix Marseille, p. 99.

Lahouel M., 2020. Contribution à l'étude des ressources génétiques du Grenadier (*Punica granatum L.* ; Punicaceae/Lythraceae) de la région de Messaad (Wilaya de Djelfa). Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme de Docteur en Sciences Agronomiques. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, p. 150.

Louaar N., 2022. Evaluation de l'effet analgésique et gastro protecteur d'écorces de *Punica granatum L.* chez des rats Wistar. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Option : Biologie et physiologie de la reproduction. Université Frères Mentouri Constantine, p. 65.

Lansky E P., Newman R A., 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, 12(3), p. 109-178.

M

Mezian N., 2019. Synthèse bibliographique sur Propriétés biologiques de la grenade. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Option : Microbiologie Appliquée. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, p 62.

Marrelli M., 2021. Medicinal Plants. *Plants*, 10(7), p. 1355.

Msomi N., Simelane M., 2018. Herbal Medicine. IntechOpen, p. 314.

Mudasir M., Dar M A., Gani I., Mir S A., Misba K., 2019. Herbal medicines as an alternative source of therapy: a review. *world Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(2), p. 374-380.

Macheix JJ., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.

Maphetu N., Unuofin J O., Masuku N P., Olisah C., Lebelo S L., 2022. Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L. (pomegranate) plant extracts: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, p. 113256.

Machado J C., Ferreira M R., Soares I A., 2023. *Punica granatum* leaves as a source of active compounds: A review of biological activities, bioactive compounds, food, and technological application. *Food Bioscience*, 51, p. 102220.

Meziane K Z., 2018. MITIDJA (Algérie) par l'obtention d'un extrait riche en polyphénols à usage alimentaire et pharmaceutique. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme de Docteur en science agronomique Option : nutrition et transformation des éléments. Université Saad Dahleb Blida 1, p. 156.

Messast A., 2021. Étude systématique critique des techniques de dosage des flavonoïdes (méthodes de trichlorure d'aluminium). Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences biologiques : Biochimie Appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra, p. 87.

Mirad M., 2013. Extraction et l'étude l'effet antibactérien des extraits polyphénoliques de la grenade *Punica granatum* vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* isolées de milieu hospitalier. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences biologiques : Microbiologie/bactériologie. Université Saad Dahlab Blida, p. 94.

Muanda F N., 2010. Identification de polyphenols, evaluation de leur activiteantioxydante et etude de leurs proprietes biologiques. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme de Docteur en chimie organique. Université Paul Verlaine-Metz, p. 295.

Nsemi M., 2010. Identification des polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Chimie organique. Université Paul Verlaine-Metz, p. 296.

Noiriel A., 2004. Étude d'une famille de gènes d'*Arabidopsis thaliana* homologues de la lécithine cholestérol acyltransférase humaine. Caractérisation d'une nouvelle phospholipase A1 et étude d'un stérol acyltransferase. Thèse réalisée pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Biologie Moléculaire et Biochimie Végétale. Université Louis Pasteur Strasbourg I, p. 262.

Naziri Z., Rajaian H., Firouzi R., 2012. Antibacterial effects of Iranian native sour and sweet pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts against various pathogenic bacteria. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, 13(4), p. 282-288.

Nikaido H., Vaara M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, 49(1), p. 1-32.

Negi P., Jayaprakasha G K., 2003. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science*, 68(4) p. 1473 – 1477.

R

Reguieg Y A., 2019. L'effet de *Punica granatum* sur la flore gastrique. Etude in vitro et in vivo chez le rat. Thèse réalisée pour obtenir le diplôme de doctorat en Biologie. Option : phytothérapie et santé. Université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem, p. 161.

Redha A A., Hasan A M., Mandeel Q., 2028. Phytochemical Determinations of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind and Aril Extracts and their Antioxidant, Antidiabetic and Antibacterial Activity. *Natural Products Chemistry & Research*, 6(4), p. 1-10.

S

Saeed A., Tariq I., Fraternali D., Sestili P., 2015. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 9(8), p. 417- 425.

Schauenberg P., Ferdinand P., 2013. Guide des plantes médicinales. Delachaux et Niestlé. Paris, p. 400.

Sanaa C., 2013. Effet de l'Irradiation sur les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes & cytoprotectrices de l'écorce de *Punica granatum*. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du

diplôme de Master en Sciences de la Vie Option : Sécurité sanitaire des aliments. Université de Carthage, p. 83.

Sihag S., Pal A., Ravikant., Saharan V., 2022. Antioxidant properties and free radicals scavenging activities of pomegranate (*Punica granatum L.*) peels: An in-vitro study. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, p. 102368.

Sarkar M., Sreedam C D., Sajal K S., Zobaer A., Sitesh C B., 2012. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Flower Extracts of *Punica granatum Linn.* (Punicaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(4), p. 133-136.

Scherrer R., Gerhardt P., 1971. Molecular sieving by the *Bacillum megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology*, 107(3), p. 718-735.

T

Tang G Y., Meng X., Li Y., Zhao C N., Liu Q., Li H B., 2017. Effects of Vegetables on Cardiovascular Diseases and Related Mechanisms. *Nutrients*, 9(8), p. 857.

Thangson C., Davidson PM., Mahakarnchanakul W., 2008. Activité antimicrobienne des épices extraites au solvant assistées par ultrasons. Jochen Weiss, Departement of food science, University of Massachusetts, Chenoweth Laboratory, Etats-Unis.

V

Vinogradova N., Glukhov A., Chaplygin V., Kumar P., Mandzhieva S., Minkina T., Rajput V D., 2023. The Content of Heavy Metals in Medicinal Plants in Various Environmental Conditions: A Review. *Horticulturae*, 9(2), p. 239.

Y

Yunfeng L., Changjiang G., Jijun Y., Jing X., Shuang C., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, p. 254-260.

Z

Zine M., Amour M., 2021. Évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits polyphénoliques issus d'*Allium cepa*. Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences biologiques : Microbiologie Appliquée. Université Ibn Khaldoun–Tiaret, p. 70.

Sites électroniques

Site web 1 : Painter S, Lindsay C : LoveToKnow. Advantages and Disadvantages of Herbal Medicine. Disponible sur : <https://www.lovetoknowhealth.com/diet-and-nutrition/advantages-and-disadvantages-of-herbal-medicine>: (consulter le 22/03/2023).

Site web 2 : Dad Khan A : Comparative advantages and disadvantages of medicinal herbs. Disponible sur : <https://www.slideshare.net/AllahDadKhan/comparative-advantages-and-disadvantages-of-medicinal-herbs-a-presentation-by-mr-allah-dad-khan> : (consulter le 22/03/2023).

Site web 3 : 4 raisons de boire une infusion de pelures de grenades. Disponible sur : <http://www.eddenya.com/question-reponse/6855-4-raisons-de-boire-une-infusion-de-pelures-de-grenades> : (consulter le 11/05/2023).

Site web 4 : Bacteria in Photos - photo gallery of bacteria. Disponible sur : <http://www.bacteriainphotos.com/> : (consulter le 15/05/2023).

Annexes

Annex 1 : Mc Ferland

Mc Ferland standard 0.5 est une solution utilisée lors de la préparation des inocula bactériens. Il se prépare en mélangeant 99.5 ml d'Acide Sulfurique (0.18 M) et 0.5 ml de Chlorure de baryum (0.048 M) dans des tubes identiques aux tubes utilisés pour la préparation de l'inoculum. Il faut le stocker dans l'obscurité à une température de 22° C à 25° C.

Après la préparation de la solution, on doit vérifier l'exactitude de la densité de Mc Ferland par le spectrophotomètre à longueur d'onde de 625 nm qui devrait être compris entre 0.08 et 0.13. Avant chaque utilisation, agiter le tube pour mélanger le fin précipité blanc de Sulfate de Baryum.

Annex 2 : Préparation de la gélose nutritive (GN)

- 1- Préparer la Gélose Nutritive en dissolvant la poudre 28 g dans de l'eau distillée 1 litre
- 2- Met dans l'Autoclave à 121° C pendant 15 minutes. Refroidir à 50 à 55°
- 3- Refroidir à 50 à 55°
- 4- Couler le milieu en boîte de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer
- 5- Les plats préparés peuvent être utilisés immédiatement ou conservés dans des sacs en plastique à 2-8 ° C jusqu'à une semaine.
- 6- Inoculation du limbe par épuisement pour obtenir des colonies isolées
- 7- Incuber les plaques aérobies pendant 18 à 24 heures et anaérobies jusqu'à 72 heures à 35-37° C (ou à d'autres températures selon la méthode utilisée).

Annex 3 : Préparation de la gélose de Muller Hinton (MH)

Gélose de Muller Hinton est une gélose standardisée pour les tests de sensibilité aux antibiotiques et sulfamides.

Pour la préparation de la gélose de Muller Hinton, on a besoin de 38 g de la poudre du Muller Hinton Agar.

Les étapes de préparation sont :

- 1- Dans un bécher, en dissolvant la poudre dans un litre de l'eau distillé, il faut l'homogénéiser et chauffer en agitant.
- 2- Porter à ébullition environ une minute.

- 3- Mettre-le dans des flacons en verre bien fermés pour stériliser à l'autoclave pendant 15 min à 121° C.

Pour l'utiliser, laisser le refroidir, puis couler en boîte de pétri (25 ml par boîte) dans un milieu stérile et laisser reposer. Ils sont prêts à l'utilisation immédiatement ou stocker à 2° C à 8° C pendant une semaine au plus.



Evaporateur rotatoire.



Balance analytique (OHAUS).



Spectrophotomètre (spectrum
SP-UV 2005).



Chambre d'observation UV
« 264/365 nm » (VILBER)
LOURMAT).



Bec benzène.



Vortex (VELP).



Balance (KERNPCB).



Agitateur magnétique (SCIOGEX).



Autoclave (Raypa) et pH mètre
(Hanna instruments).



Bain Marie (nive bath, MEMMERT).

<p align="center">Présenté par : LAKHNECHE Ahlem ; RAHAL Hana SEKKIOU Kewther</p>	<p align="center">Encadré par : Mr. MAAMAR Hichem</p>									
<p align="center">Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée</p>										
<p align="center">Thème : Caractérisation des activités biologiques de plusieurs extraits de la plante « <i>Punica granatum L.</i> »</p>										
<p><i>Punica granatum</i> est une plante appartenant à la famille des <i>Lauracée</i>, elle est considérée comme l'une des plantes les plus anciennes et les plus célèbres depuis l'Antiquité. Cette étude vise à comparer l'extrait méthanolique (EMPG), l'extrait éthanolique (EEPG) et l'extrait butanolique (EBPG) de l'écorce du fruit de <i>Punica granatum L.</i> Les tests phytochimiques ont montré la présence de flavonoïdes, de tanins, de quinones libres, de saponines, de terpénoïdes, et des composés réducteurs dans tous les extraits. Les analyses qualitatives par chromatographie (CCM) ont révélé la présence des différentes classes flavonoïques susceptibles d'exprimer les activités recherchées. Les examens quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteau et des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ ont révélé que les concentrations les plus élevées de polyphénols et de flavonoïdes ont été trouvées dans l'extrait EEPG (52,469±3,191 µg/mg EAG) et dans l'extrait EMPG avec une valeur de (32,729±0,342 µg EQ/mg), respectivement. Les résultats de l'activité antioxydante effectuée en utilisant la méthode de réduction des radicaux DDPH, ont indiqué la supériorité de l'extrait EMPG avec le pourcentage le plus élevé de 92,46±0,43. Dans l'activité antibactérienne, l'écorce de <i>Punica granatum L.</i> a montré une activité remarquable sur quatre souches bactériennes étudiées, qui sont <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Klebsiella pneumonia</i>.</p> <p>En conclusion, <i>Punica granatum L.</i> est doué d'une activité antioxydante et antibactérienne remarquables. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle afin d'atténuer les complications du stress oxydant associer ou déclenchant d'autres maladies et une bonne alternative aux antibiotiques contre les infections bactériennes.</p>										
<p>Mots-clés : <i>Punica granatum</i>, activité antibactérienne, activité antioxydante, CCM, polyphénols, flavonoïdes.</p>										
<p>Jury de soutenance :</p> <table border="0"> <tr> <td>Présidente : Mme. KRIM Meriem</td> <td>(M.C.B)</td> <td>Univ Abbes Laghrour-Khenchela</td> </tr> <tr> <td>Promotrice : Mr. MAAMAR Hichem</td> <td>(M.C.B)</td> <td>Univ Abbes Laghrour-Khenchela</td> </tr> <tr> <td>Examineur : Mme. MELAL Hanan</td> <td>(M.C.B)</td> <td>Univ Abbes Laghrour-Khenchela</td> </tr> </table>		Présidente : Mme. KRIM Meriem	(M.C.B)	Univ Abbes Laghrour-Khenchela	Promotrice : Mr. MAAMAR Hichem	(M.C.B)	Univ Abbes Laghrour-Khenchela	Examineur : Mme. MELAL Hanan	(M.C.B)	Univ Abbes Laghrour-Khenchela
Présidente : Mme. KRIM Meriem	(M.C.B)	Univ Abbes Laghrour-Khenchela								
Promotrice : Mr. MAAMAR Hichem	(M.C.B)	Univ Abbes Laghrour-Khenchela								
Examineur : Mme. MELAL Hanan	(M.C.B)	Univ Abbes Laghrour-Khenchela								