



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 en Biologie

FILIERE : **Sciences Biologiques**

OPTION : **Biochimie Appliquée**

Thème

Caractérisation de quelques activités

biologiques de la plante médicinale

« Punica granatum L. »

Présenté par :

BOUDJIL Billel

Membres de jury :

Président : Mr. AICHE Med Amine (M.C.B) Université Abbes Laghrour-Khenchela

Promoteur : Mr. MAAMAR Hichem (M.C.B) Université Abbes Laghrour-Khenchela

Examinatrice : Mme. KRIM Meriem (M.C.B) Université Abbes Laghrour-Khenchela

Année universitaire : 2022– 2023

Remerciements

*Avant tout, je remercie **Allah**, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience afin de réaliser ce travail.*

*Mes premières remerciements vont à **Mr. MAAMAR Hichem** maitre de conférences B, Département de biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre et de l'univers, Université Abbes Laghrour-Khenchela, d'avoir accepté d'encadrer et de diriger ce travaille avec une grande rigueur scientifique, pour ses encouragements et ses conseils judicieux tout le long de la réalisation de ce mémoire.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Mme. KRIM Meriem**. Maitre de conférences B au département de biologie Université Abbes Laghrour-Khenchela, d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mme. **MALEL Hanan**. Maitre de conférence B au département de biologie Université Abbes Laghrour-Khenchela, qui ma fait l'honneur d'examiner mon travaille.*

Nous remercions également les responsables des laboratoires pédagogiques de biologie de l'Université Abbas Laghrour -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.

A toutes les personnes dont les noms ne sont pas cités mais qui se reconnaîtront, je leur adresse un hommage pour tous ses encouragements.

Dédicace

Au nom d'Allah, que la prière et le salut soient sur le messager d'Allah.

Je dédie ce travail:

A toute ma famille et principalement ma mère et ma femme pour leur motivation et leur encouragement.

A mes sœurs et mon frère que j'adore.

A mes amis.

A tous ceux qui me sont chers.

Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction	01
Première partie: Etude bibliographique.	
Chapitre I: Généralités sur les plantes médicinales.	
I.1. Définition	02
I.2. La phytothérapie	02
I.2.1. Définition	02
I.2.2. Différents types de la phytothérapie	02
I.2.3. Les avantages	04
I.2.4. Les inconvénients	04
I.3. Présentation générale de <i>Punica granatum</i>	05
I.3.1. Nomenclature	05
I.3.2. Répartition géographique	05
I.3.3. Description botanique	05
I.4. Variétés	08
I.5. Applications	08
I.5.1. Alimentaire humaine	08
I.5.2. Activités industrielles	08
I.5.3. Utilisation médicinales	09
I.5.4. Autres utilisations	09
Chapitre II: les métabolites secondaires.	
II.1. Définition	10
II.2. Classification	10
II.2.1. Composés phénoliques	10
II.2.1.a. Les flavonoïdes	10
II.2.1.b. Les tanins	11

II.2.1.c. Les quinones	12
II.2.1.d. Les lignines	12
II.2.1.e. Les coumarines	13
II.2.1.f. Saponines	14
II.2.2. Composé terpéniques	14
II.2.3. Les alcaloïdes	15

Chapitre III : Les activités biologiques.

III.1. Activité antioxydante	17
III.1.1. Le stress oxydatif	17
III.1.2. Les radicaux libres	17
III.1.2.a. Définition	17
III.1.2.b. Les types des radicaux libres	17
III.1.2.c. Les sources des radicaux libres	18
III.1.2.d. Le rôle des radicaux libres	18
III.1.3. Antioxydant	18
III.1.3.a. Définition	18
III.1.3.b. Mécanisme d'action des antioxydants	19
III.1.3.c. Principaux antioxydants	19
III.2. Activité antibactérienne	20
III.2.1. Les bactéries	20
III.2.1.a. Définition	20
III.2.1.b. Formes	20
III.2.2. Les agents antibactériens	20
III.2.2.a. Définition	20
III.2.2.b. Classification	20

Deuxième partie: Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel	23
I.1.1. Matériel végétal	23
I.1.2. Souche bactérienne	23
I.1.3. Equipements et réactifs chimiques	23
I.2. Méthodes	25
I.2.1. Préparation des extraits	25

I.2.1.a. Préparation de l'extrait aqueux par infusion (EAI)	25
I.2.1.b. Préparation de l'extrait aqueux par décoction (EAD)	25
I.2.2. Tests phytochimiques	25
I.2.2.a. Flavonoïdes : Test de Shinoda	25
I.2.2.b. Saponosides : Test de Mousse	26
I.2.2.c. Tanins	26
I.2.2.d. Quinone libre	26
I.2.2.e. Coumarines : Fluorescences UV.	26
I.2.2.f. Stérols et Triterpènes : Test de Liebermann-Burchard.	26
I.2.2.g. Composés réducteurs	26
I.2.2.h. Terpènes : Test de Salkowski	26
I.2.2.i. Alcaloïdes	27
I.2.2.j. Anthraquinone	27
I.2.3. Essai de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)	27
I.2.4. Dosage des polyphénols totaux	28
I.2.5. Dosage des flavonoïdes	29
I.2.6. Evaluation de l'activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre DPPH)	30
I.2.7. Evaluation de l'activité anti bactérienne(méthodes des disques)	31
Chapitre II: Résultats et discussion	
II.1. Etude phytochimique	34
II.1.1. Rendements des extraits	34
II.1.2. Tests phytochimiques	35
II.1.3. Résultats de l'étude qualitative par CCM	38
II.1.4. Dosage des polyphénols totaux	40
II.1.5. Dosage des flavonoïdes	42
II.2. Evaluation de l'activité antioxydante	44
II.3. Evaluation de l'activité antibactérienne	45
Conclusion	49
Références bibliographiques	50
Annexes	

Listes des figures

N° de figure	Titre	Page
01	le grenadier	06
02	fleurs et fruits du grenadier (<i>Punica granatum</i>)	07
03	Squelette de base des flavonoïdes	10
04	La structure des tanins hydrolysables (a) et des tanins condensé (b)	11
05	structure chimique des quinones	12
06	Structure d'une lignine	13
07	Structure de base des coumarines	13
08	Structure d'une saponine	14
09	Structure d'isoprène	15
10	Structure de base d'une alcaloïde	15
11	Mode opératoire de dosage des polyphénols	29
12	Mode opératoire de dosage des flavonoïdes	30
13	Réduction du DPPH• par un antioxydant	31

14	Rendement des deux extrait EAI et EAD du <i>Punica granatum</i>	34
15	Quelques résultats des tests phytochimiques sur l'EAI	36
16	Quelques résultats des tests phytochimiques sur l'EAD	37
17	Photos de chromatogramme résultant de l'analyse de l'EAI et de l'EAD par CCM sur gel de silice par le système de solvant 01 : (a) à 254nm et (b) à 365nm	38
18	Photos de chromatogramme résultant de l'analyse de l'EAI et de l'EAD par CCM sur gel de silice par le système de solvant 02 : (a) à 254nm et (b) à 365nm	39
19	Photos de chromatogramme résultant de l'analyse de l'EAI et de l'EAD par CCM sur gel de silice par le système de solvant 03 : (a) à 254nm et (b) à 365nm	39
20	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	41
21	Teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg}$)	41
22	Courbe d'étalonnage de la quercétine	43
23	Teneur en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mg E}$)	43
24	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonctions des différentes concentrations de l'EAI et de l'EAD	44
25	Répartition graphique de l'activité antibactérienne pour une concentration 300mg/ml des deux extraits EAI et EAD	46
26	Répartition graphique de l'activité antibactérienne pour une concentration 400mg/ml des deux extraits EAI et EAD	47
27	Résultats de l'activité antibactérienne de l'EAI	47
28	Résultats de l'activité antibactérienne de l'EAD	48

Listes des tableaux

N° de tableau	Titre	Page
01	Caractéristiques des principales variétés de la grenade	08
02	Principales ERO radiculaires et non radiculaires	17
03	Souches utilisées dans l'activité antibactérienne	23
04	Matériel et appareillage utilisés	23
05	Réactifs chimiques et solvants utilisés	24
06	Différents systèmes de solvants utilisés	27
07	Le rendement des extraits de <i>Punica granatum</i>	34
08	Résultats des tests phytochimiques sur l'EAI et l'EAD	35
09	Résultats de la CCM de l'EAI et l'EAD par différents système de solvant	39
10	Teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g EQ/mg E}$) des deux extraits EAI et EAD	42
11	Teneur en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mg E}$) des deux extraits EAI et EAD	43
12	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les deux extrait (EAI) et (EAD) du <i>Punica granatum</i>	44
13	Résultats de diamètre des zones d'inhibition de croissance bactérienne	46

Abréviations

AAG : Acide acétique glacial.

Abs : Absorbance.

AlCl₃ :Chlorure d'aluminium.

CCl₄: Chloroforme.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

C₄H₆O₃: Anhydre acétique.

cm : Centimètre.

°C : Degré celsius.

DMSO : Diméthyl sulfoxyde.

DPPH : Diphényl Picrylhydrazyl C₁₈H₁₂N₅O₆.

EAD : Extrait aqueux par décoction.

EAI : Extrait aqueux par infusion.

ERO : Espèces réactives oxygénés.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

HCl : Acide chlorhydrique.

h : Heure.

IC₅₀ : Inhibitive concentration of 50%.

min : Minute.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium.

nm : Nanomètre.

R: Rendement exprimé.

RF : Rapport frontal.

ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

PI : Pourcentage d'inhibition.

UV : Ultraviolet.

ZI : Zone d'inhibition.

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

µg EAG/mg E :Equivalent microgramme acide gallique par mg d'extrait.

% : Pourcentage.

Résumé

Punica granatum est une plante appartenant à la famille des Punicaceae (Lythracées), elle est considérée comme l'une des plantes médicinales et comme un symbole de beauté. Cette étude vise à comparer deux extraits aqueux de *Punica granatum* préparés par infusion (EAI) et décoction (EAD), dont la composition chimique et les activités biologiques ont été testées.

Les tests phytochimiques ont montré la présence des flavonoïdes, des tanins, des quinones libres, des terpénoïdes, des saponosides et des composés réducteurs et de dans les deux extraits. Nos résultats ont également montré des résultats négatifs à la fois pour les coumarines, les anthraquinones, les alcaloïdes, stéroïdes et les triterpènes.

La chromatographie sur couche mince (CCM) a montré que l'EAI est plus riche en flavonoïdes que l'EAD.

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'EAI avec $1163.76 \pm 18 \mu\text{g}/\text{mg}$ EAG pour les polyphénols et de $769.68 \pm 30 \mu\text{g EQ}/\text{mg}$ pour les flavonoïdes.

Les résultats de l'activité antioxydante effectuée en utilisant la méthode de réduction des radicaux DDPH, indiquent que l'EAI possède un grand potentiel antioxydant par rapport à l'EAD.

Dans l'activité antibactérienne (méthode de disque), *Punica granatum* a montré une activité remarquable sur quatre souches bactériennes étudiées, qui sont *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumonia*.

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

Abstract

Punica granatum is a plant belonging to the Punicaceae family (Lythraceae), and is considered to be one of the medicinal plants and a symbol of beauty.

The aim of this study was to compare two aqueous extracts of *Punica granatum* prepared by infusion (EAI) and decoction (EAD), with chemical composition and biological activities were tested.

Phytochemical tests showed the presence of flavonoids, tannins, free quinones, terpenoids, saponosides and reducing compounds in both extracts. Our results also showed negative results for both coumarins, anthraquinones, alkaloids, sterols and triterpenes.

Thin layer chromatography (TLC) showed that EAI is richer in flavonoids than EAD.

Quantitative examinations of total polyphenols by the Folin-ciocalteau method and flavonoids by the AlCl₃ method revealed that the highest concentrations of polyphenols and flavonoids were found in EAI with 1163.76±18µg/mg EAG for polyphenols and 769.68±30µg EQ/mg for flavonoids.

The results of the antioxidant activity carried out using the DDPH radical reduction method indicate that EAI has a high antioxidant potential compared with EAD.

In terms of antibacterial activity, *Punica granatum* showed remarkable activity against four bacterial strains studied, namely *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*.

Key words: *Punica granatum*, antibacterial activity, antioxidant activity, polyphenols, flavonoids.

ملخص

Punica granatum هو نبات ينتمي إلى عائلة Punicaceaes (Lythracées) ، ويعتبر أحد النباتات الطبية ورمزًا للجمال .

تهدف هذه الدراسة إلى مقارنة مستخلصين مائيين من *Punica granatum* المحضرين عن طريق التسريب (EAI) و decoction ، والتي تم اختبار التركيب الكيميائي والأنشطة البيولوجية لها. أظهرت الاختبارات الكيميائية النباتية وجود مركبات الفلافونويد والتانينات والكينونات الحرة والتربينويدات والصابونوزيدات ومركبات الاختزال وفي المستخلصين. أظهرت نتائجنا أيضًا نتائج سلبية للكومارين ، الأنتراكينونات ، القلويدات ، الستيرول والتريتربين.

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) أظهرت أن EAI أكثر ثراءً في مركبات الفلافونويد من EAD. كشفت الفحوصات الكمية من البوليفينول الكلي باستخدام طريقة Folin-ciocalteau والفلافونويد باستخدام طريقة AIC13 أنه تم العثور على أعلى تركيزات من البوليفينول والفلافونويد في EAI مع 1163.76 ± 18 ميكروغرام / ملغ EAG للبوليفينول و 769.68 ± 30 mg EQ / μ g للفلافونويد.

تشير نتائج النشاط المضاد للأوكسدة الذي تم إجراؤه باستخدام طريقة DDPH للحد من الجذور إلى أن EAI لديه إمكانات كبيرة مضادة للأوكسدة مقارنة بـ EAD.

في النشاط المضاد للبكتيريا ، أظهر *Punica granatum* نشاطًا ملحوظًا على أربع سلالات بكتيرية تمت دراستها ، وهي المكورات العنقودية الذهبية ، العصوية الرقيقة ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae*.

الكلمات الرئيسية: *Punica granatum* ، النشاط المضاد للبكتيريا ، النشاط المضاد للأوكسدة ، البوليفينول ، الفلافونويد

Introduction

Ces dernières années, les bienfaits pour la santé de la consommation régulière de fruits et de légumes ont beaucoup attiré l'attention. Cette valeur nutritionnelle réside dans une grande variété de molécules bioactives (fibres, caroténoïdes, composés phénoliques, vitamines, etc.) (Tomas-Barberan et Gil, 2008).

La grenade est l'un des produits les plus riches en antioxydants, notamment en polyphénols solubles, en tanins et en anthocyanes (Gil *et al.*, 2000).

Ses extraits ont de multiples activités biologiques telles que l'élimination des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne et la réduction du risque de maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires et de certains cancers (Mena *et al.*, 2011).

Les extraits de grenade sont également utiles dans la prévention ou le traitement de l'athérosclérose, de la diarrhée, des ulcères gastriques et des troubles liés aux œstrogènes tels que la maladie de Paget du mamelon (Holland *et al.*, 2009).

Dans ce travail nous sommes intéressé à réaliser une étude phytochimique (screening phytochimique, la séparation des principaux métabolites par la chromatographie, sur couche mince (CCM), dosage des polyphénols et des flavonoïdes) et d'effectuer une recherche sur l'activité antioxydante et l'antibactérienne *in vitro* du *Punica granatum*.

Dans cette étude, ce mémoire est composé de deux parties :

- ✓ La première partie représente le développement de la synthèse bibliographique. Il est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré aux plantes d'intérêt. Le second chapitre présente les métabolites secondaires ou composants actifs de la plante, et enfin, le troisième chapitre décrit l'activité biologique de cette plante que nous allons étudier.
- ✓ La deuxième partie (Pratique) se compose de deux chapitres. Dans le premier chapitre nous décrivons en détail les matériels (plantes, équipements...) ainsi que les techniques et procédés (extraction, dosage...) utilisés pour les études biologiques de notre plante *Punica granatum*. Le second chapitre présentera les principaux résultats obtenus et leur discussion.

Première partie: Etude bibliographique.

Chapitre I: Généralités sur les plantes médicinales.

I.1. Définition

Les plantes médicinales désignent toutes les plantes qui contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées en thérapie ou des substances précurseurs pour la synthèse des médicament (**Sofowora, 2010**).Elles ont un effet thérapeutique sur l'organisme sans être toxiques à dose normale (**Debuigne et couplan, 2013**). Elles ne sont pas seulement des plantes, mais aussi des arbres, des arbustes, des champignons, des légumes, des racines, des algues... etc. C'est pourquoi on parle d'espèces végétales(**Bousta et Ennabili, 2011**).

I.2. La phytothérapie

I.2.1. Définition

Le mot phytothérapie est étymologiquement composé de deux racines grecques: "*phyton*" et "*therapeia*" , signifiant respectivement "plante" et "traitement"(**Rwangobo, 1993**).C'est le traitement naturel de diverses affections du corps humain à l'aide de plantes ou d'herbes (poudres, ampoules, infusions... etc.).Elle représente le meilleur moyen de prévenir et de traiter la plupart des maladies du quotidien (**Bouakrif, 2016**).La phytothérapie n'est pas une thérapie inoffensive, certaines plantes médicinales sont toxiques, d'autres peuvent avoir des effets secondaires cumulatifs. La connaissance des plantes et le respect de leurs indications sont fondamentaux pour une pratique phytothérapeutique correcte (**Bouzouita, 2016**).

I.2.2. Différents types de la phytothérapie

✓ L'aromathérapie

L'aromathérapie se définit littéralement comme la partie de la phytothérapie qui utilise les huiles essentielles (**Lardry et al., 2007**). Elle est considérée comme l'un des arts de guérison les plus anciens lorsque les Égyptiens utilisaient des substances aromatiques dans les médicaments 4500 ans avant J.-C. L'aromathérapie utilise de nombreux extraits de plantes et de substances naturelles et aromatiques sécrétées par les feuilles, les tiges, les fleurs et d'autres parties de la plante, qui sont extraites par distillation (**Halder et al., 2018**).

Le moyen le plus rapide et le moins toxique de bénéficier du médicament est à travers la peau (**Oullai et Chamek, 2018**). Les huiles essentielles les plus courantes sont : la lavande, la citronnelle, le fenouil, le géranium, etc. (**Halder et al., 2018**).

✓ La gemmothérapie

Le mot « gemmothérapie » vient du latin « gemmae » signifiant « bourgeon », du grec « therapeia » signifiant « cure ». La gemmothérapie est une forme de phytothérapie basée sur l'utilisation de tissus végétaux vivants à caractère embryonnaire de plantes, d'arbres et d'arbustes tels que les pousses fraîches, les jeunes pousses, les racines, l'écorce interne des racines ou des tiges (**Dursus, 2018**).

Les germes abritent des acides aminés, de nombreuses protéines, des micronutriments, des polyphénols, des antioxydants et des enzymes. Certaines pousses renferment des dérivés terpéniques, par exemple le cassis, qui a une concentration plus élevée, au niveau des pousses, que la plante elle-même (**Oullai et Chamek, 2018**).

✓ L'herboristerie

Le terme herboristerie désigne la pratique médicale populaire et traditionnelle basée sur l'utilisation de plantes et d'extraits de plantes. Le traitement à base de plantes est également connu sous le nom de phytothérapie. L'utilisation d'herbes pour traiter les maladies est presque universelle dans les sociétés non industrielles (**Kamou et al., 2018**). Le traitement à base de plantes utilise soit des herbes fraîches, soit des herbes séchées, ou utilise une partie ou l'herbe toute entière (**Oullai et Chamek, 2018**).

✓ L'homéopathie

L'homéopathie vient des mots grecs (*homios*), qui signifie similitude, et (*pathos*), qui signifie maladie (**Lloyd, 2009**). L'homéopathie est un système de traitement médical développé par le médecin allemand Samuel Hahnemann à la fin du XVIIIe siècle qui utilise des produits très dilués pour favoriser la guérison (**Kim et Hyung, 2021**), en administrant de minuscules quantités de substances censées causer la maladie comme moyen de traiter la maladie, par exemple : des extraits végétaux (d'organes) et/ou des extraits animaux divers (**Burks et al., 2019**).

✓ La phytothérapie chinoise

La médecine traditionnelle chinoise (MTC) est une partie avancée de la culture chinoise remontant à l'Antiquité et s'étendant sur plus de 3000 ans (**Lloyd, 2009**). La MTC comprend de nombreuses pratiques médicales et paramédicales qui incluent de nombreuses

formes différentes, notamment la phytothérapie, l'acupuncture, le massage (tui na), l'exercice (qigong), les modifications du régime alimentaire et du mode de vie, la thérapie par ventouses, le guasha et l'orthopédie (Dai Da) **(Barthel, 2021)**.

✓ La phyto balnéothérapie

La phyto balnéothérapie est l'ajout d'extraits de plantes dans des bains chauds. Elle est également appelée l'hydrothérapie de KNEIPP **(Oullai et Chamek, 2018)**.

L'hydrothérapie est utilisée par les civilisations humaines depuis des milliers d'années pour soulager la douleur, détendre les muscles et traiter de nombreux maux. Elle est également considérée comme une méthode thérapeutique douce et efficace dans la culture moderne. L'application thérapeutique de l'eau peut être utilisée de nombreuses façons, à la fois à l'intérieur et à l'extérieur du corps **(Pizzorno !., 2020)**.

I.2.3. Les avantages

Les plus importants de ces avantages sont :

- Elle est basée sur des substances naturelles disponibles directement dans la nature qui peuvent être facilement obtenues chez un herboriste sans ordonnance.
- Les herbes naturelles sont moins chères et moins polluantes que les médicaments industriels **(Oullai et Chamek, 2018)**.
- Elle est utilisée dans notre alimentation quotidienne sous forme d'épices ou de boissons, et elle est également utilisée dans les teintures et la fabrication de cosmétiques et de pharmacie **(Souilah, 2018)**.
- Les plantes médicinales traitent de nombreux problèmes de santé sans aucune intervention chirurgicale, dont les plus importants sont les maladies du foie, le diabète et les troubles digestifs. Par exemple le Taxol (molécule utilisée pour traiter le cancer) extrait de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) **(Oullai et Chamek, 2018)**.

I.2.4. Les inconvénients

les plantes médicinales présentent de nombreux inconvénients, notamment :

- Le traitement à base de plantes prend plus de temps que les médicaments chimiques.
- Certaines plantes contiennent des toxines fortes qui peuvent entraîner la mort.
- De nombreuses herbes peuvent provoquer des réactions allergiques car elles contiennent plusieurs ingrédients à base de plantes, tels que : le pollen.

- Il existe de nombreuses herbes qui sont dangereuses pour les femmes enceintes et les enfants.
- Manger une dose excessive de certaines plantes et ne pas respecter la dose indiquée peut entraîner une intoxication (**Oullai et Chamek, 2018**).
- L'ignorance et le manque de connaissance des ingrédients des herbes, et les mauvaises façons de les consommer ou de mélanger les plantes peuvent conduire à un empoisonnement.
- La prise simultanée de plantes médicinales et de médicaments peut entraîner l'interaction des deux remèdes et l'apparition d'effets secondaires, parfois graves.
- Certaines plantes peuvent provoquer une diminution de la pression artérielle, comme c'est le cas dans les herbes diurétiques (**Benghanou, 2012**).

I.3. Présentation générale de *Punica granatum*

le grenadier est un arbre important dans les régions tropicales et subtropicales qu'est valorisé par ses fruits comestibles.

I.3.1. Nomenclature

Nom scientifique	<i>Punica granatum</i>
Nom arabe	Romane
Nom anglais	Pomegranate
Nom français	Grenadier
Nom espagnol	Granado
Nom italien	Melograno

I.3.2. Répartition géographique

Le grenadier appartient au centre du Moyen-Orient, y compris l'Asie inférieure ; l'Iran et le Turkménistan. Il a été adapté à la région méditerranéenne pendant des siècles en raison de la facilité de la propagation et de germination de ses graines, dispersées par l'homme, les oiseaux et d'autres animaux, elle existe depuis l'Antiquité (**Sanchez-Monge, 1974**).

I.3.3. Description botanique

Le grenadier est un arbre fruitier caducifolié de petites dimensions, dont la hauteur moyenne est de 3 à 4 mètres. Sa forme naturelle est buissonnante, il donne de nombreux rejets. Les rameaux sont grêles, parfois épineux (**Site web 01**) (figure 01 et 02).



Figure 01: le grenadier (Site Web 02).

✓ Feuilles

Les feuilles du grenadier sont caduques, opposées et disposées sur les rejets comme elles peuvent être en touffes sur les poussés courtes, glabres sur les deux faces ; la face supérieure est de couleur verte foncé, montre une nervure médiane déprimée, et la face inférieure est de couleur verte claire, montre une nervure médiane très saillante (Godet, 1991). Ces feuilles entières, brillantes assez coriaces, présentent un limbe elliptique allongé de 3 à 8 cm de long, de sommet obtus ou allongé, munies d'un court pétiole rougeâtre (Godet, 1991).

✓ Fleurs

Le grenadier est un arbre monoïque autofertile, il porte sur le même arbre des fleurs mâles qui produisent le pollen et des fleurs femelles qui portent les ovules et qui donnent les fruits. Le grenadier fleurit pendant l'été de Mai à Aout, ses fleurs sont rouge vif et mesurent presque 3 cm de diamètre, elles sont sessiles, solitaires ou de 2 à 3 au sommet des rameaux. Le calice est rouge, charnu, à tube soudé à l'ovaire, il a 4 à 8 lobes coriaces et persistants. La fleur du grenadier possède 4 à 8 pétales épais, froissés, grands et insérés à la gorge du calice.

Le gynécée est formé de 8 à 9 carpelles soudés à la paroi du calice disposés sur deux verticilles. Les étamines sont nombreuses. Un seul style à stigmate en tête (Site Web 03).

✓ **Fruits**

Les fruits du grenadier sont appelés grenades. Ce sont de grosses baies ronds dont le péricarpe est surmonté des restes du calice en forme de couronne. Une grenade a presque la taille d'une grosse orange de 7 à 12cm de diamètre. Elle contient en moyenne 600 graines pulpeuses. Son écorce est épaisse , dure et coriace , de couleur rouge ou jaune beige. L'intérieur du fruit est divisé en quelques loges ou compartiments séparés par de légères cloisons, chaque loge est remplie d'arilles. Ces dernières sont des graines polyédriques plus ou moins ligneuses et enveloppées d'une pulpe juteuse , elles sont d'un rose grenat plus ou moins foncé selon les variétés. Seules ces graines ou arilles sont consommables (Site Web 03).

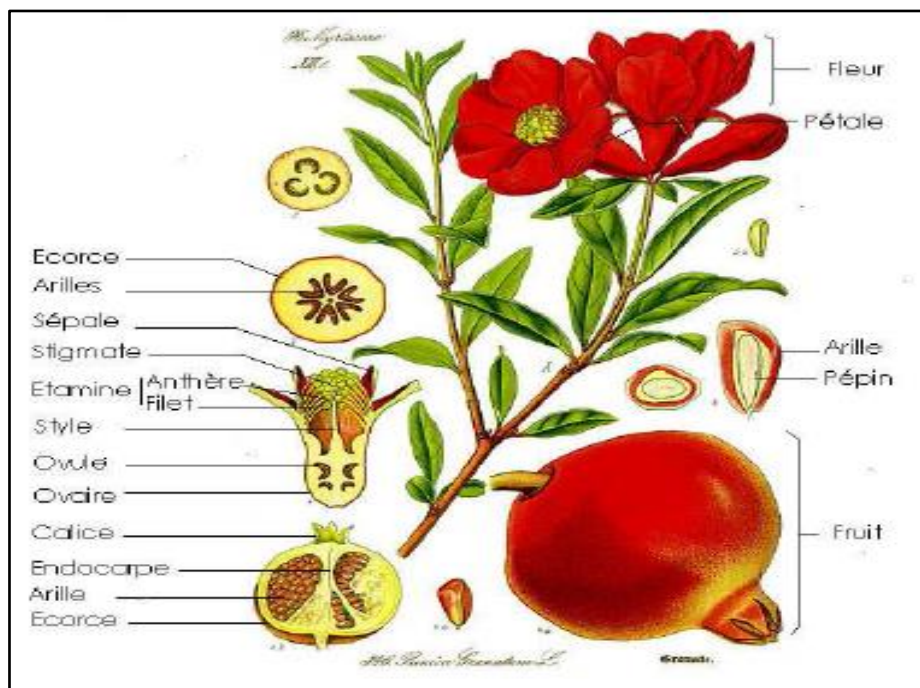


Figure 02: Fleurs et fruits du grenadier (*Punica granatum*) (Flora von Deutschland et Schweiz, 1885).

✓ **Ecorce du fruit**

L'écorce du fruit du grenadier ou autrement appelé malicorium, il s'agit de la partie externe et dure du fruit. La couleur de la face externe dépend de la variété et brillant, alors que la face interne est jaunâtre, concave, portant l'empreinte des graines , de saveur amère et astringente.

I.4. Variétés

Il existe plusieurs variétés de grenades et les critères de différenciation les plus utilisés sont : la taille du fruit, la couleur de l'écorce , la couleur des graines , la dureté du noyau, la teneur en jus , l'acidité et l'astringence et la maturité (**Lansky et Newman, 2007**).

Tableau 01: Caractéristiques des principales variétés de la grenade.

Variété	Couleur externe	Couleur des arilles	Gout des arilles
Wonderful	Rouge foncé	Rouge	Doux/Acide
Mollar d'Elche	Rouge/Jaune	Rouge clair	Doux
Herskowitz/Hershkovitz	Rouge foncé	Rouge clair	Acide
Acco	Rouge	Rouge foncé	Doux
Emek	Rouge foncé	Rouge	Doux/léger Acide
Baghwa	Rouge clair	Rouge clair	Doux
Hicaz	Rouge	Rouge clair	Doux/Acide
Shani	Rouge	Rouge foncé	Doux
Earty Foothill	Rouge foncé	Rouge	Acide

I.5. Applications

Le grenadier est comme les autres plante a plusieurs utilisation, on peut citer:

I.5.1. Alimentaire humaine

La partie comestible de la grenade constitue environ 52% du poids du fruit (**Abbasi et al., 2008**).C'est un fruit riche en vitamine C et en éléments minéraux, mieux consommée fraîche ou trempée dans du jus de grenade rafraîchissant (**Oukablki, 2004**).Le jus de grenade est une boisson très populaire dans l'Iran (**Morton, 1987**).

I.5.2. Activités industrielles

Les grenades offrent une variété de teinture avec une grande variété de couleurs telles que les verts, une large gamme de jaunes , de gris ,de bruns et de noirs Les parties utilisées par cet arbre sont principalement l'écorce des fruits, les fleurs; l'écorce des racines, la tige et le tronc.L'écorce du fruit et les fleurs sont utilisées pour teindre le textile. Toutes les parties de l'arbre ont été utilisées comme sources de tannins lors du tannage des peaux. (**Wald, 2009**).

I.5.3. Utilisation médicinales

Le grenadier a été largement utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreuses cultures (**Lansky *et al*, 2000**).

Les pelures , les racines et les feuilles de grenade ont été utilisées en décoction pour traiter la diarrhée, les troubles digestifs et pour arrêter les saignement.

Les fleurs séchées sont utilisées pour traiter la bronchite et l'inflammation buccale (**Stover et Mercury, 2007**). La fleur de grenade a été utilisé pour soulager les épistaxis , otites et hémorragies. L'ingestion de trois fleurs de grenade permet de protéger les yeux (**Ducouthial, 2003**).

L'utilisation de l'écorce sèche de grenade pour la dysenterie (**Aviram et dornfeld, 2001**). La peau séchée de grenade est indiqué en cas de diarrhée chronique, dysenterie chronique, présence de sang dans les selles, prolapsus rectal, spermatorrhée, hyperménorrhée, accumulation de parasites, douleurs abdominales et dermatophytie.

Le jus de grenade a été utilisé pour le traitement de la leucorrhée (favorise l'écoulement rouge).

I.5.4. Autres utilisations

En cosmétologie, l'acide ellagique et ses dérivés (composés présents dans le jus et la peau de grenade) permettent de protéger la peau el les matières kératinisée contre les effets délétères des gaz toxique. Le grenade possède de très belles fleurs colorées d'une grande valeur ornementale.

Chapitre II: les métabolites secondaires.

II.1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures, jouant le rôle d'un agent protecteur contre le stress physique. Ils appartiennent à des groupes chimiques variés, alcaloïdes, composé phénolique et les terpènes. Les métabolites secondaires représentent une source importante de molécule utilisable dans des domaines aussi différents que la pharmacologie, agroalimentaire et cosmétologie (Macheix, 2005).

II.2. Classification

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires:

- Composés phénoliques.
- Composés terpéniques.
- Alcaloïdes.

II.2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques (polyphénols) sont des molécules appartenant au métabolites secondaires. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, la tyrosine et surtout de la phénylalanine (Guignard, 2000). Les composés phénoliques sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques chez les plantes et dans leurs interactions avec l'environnement, leurs structures et leurs confères des fonctions très spécifiques (Desjardins, 2008).

II.2.1.a. Les flavonoïdes

➤ Définition

Les flavonoïdes (du latin *flavus*: jaune), sont des substances généralement colorées répandues chez les végétaux; elles sont trouvées dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guignard, 1996). Ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques (Bruneton, 1999) (figure 03).

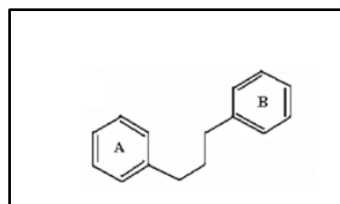


Figure 03 : Squelette de base des flavonoïdes (Dean, 1963).

Selon la structure chimique, les flavonoïdes peuvent se diviser en six classes: flavanols, flavones ,flavonols ,flavanones , isoflavones et anthocyanidines (**Medic-Sanic et al., 2004**).

➤ **Localisation**

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois.(**Site Web 04**).

➤ **Propriétés**

- Contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs.
- Contrôler la croissance et le développement des plantes (**Middelton et kardasnam, 1993**).
- Repousser certains insectes par leur goût désagréable (rôle protecteur) (**Alibert et al., 1997**).
- Moduler l'activité de certaines enzymes et modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires.
- Exercer des activités antioxydantes, vasculoprotectrices, anti hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, anti ulcéreuses et anti tumorales (**Ghedira, 2005**).

II.2.1.b. Les tanins

➤ **Définition**

Les tanins sont des polyphénols que l'on retrouve dans de nombreux végétaux comme les écorces et les fruits (raisins , grenades , dattes , cafés , cacao ... etc.). Leurs structures complexes sont constituées d'unités monomériques répétitives dont les centres asymétriques et les degrés d'oxydation varient (**Hemingway, 1992**)(figure 04).

Les tanins sont divisés en deux groupes:

- **Les tanins hydrolysables:** ester des acides-phénols et de glucose.
- **Les tanins condensés:** formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères).

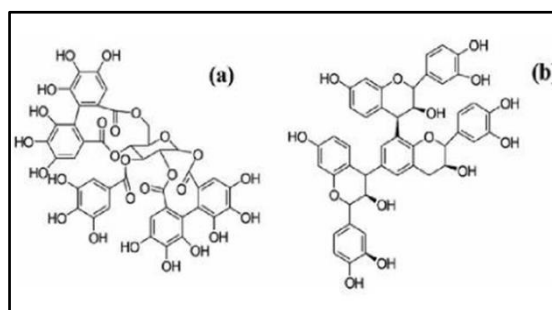


Figure 04: La structure des tanins hydrolysables (a) et des tanins condensé (b)(**Pandian et al., 2014**).

➤ **Localisation**

Les tanins se trouvent dans divers organes: racine(ratanhia), écorce (chêne), feuilles (hamamélis), fleurs(rose rouge), fruit (péricarpe du noyer), graine (kola).On observe surtout une accumulation dans les tissus âgés et les tissus d'origines pathologiques(galles)(**site web 05**).

➤ **Propriétés**

- Coaguler les protéines du derme (utilisation pour le tannage des peaux).
- Précipiter les protéines de la salive (action astringente); cette propriété rend les tissus riches en tanins peu consommables par les herbivores , c'est un mode de défense de la plante (**Botineau, 2010**).

II.2.1.c. Les quinones

➤ **Définition**

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques (**Bruneton, 1999**). Ils sont issus de l'oxydation de phénols (**Bruneton, 2010**)(figure 05).

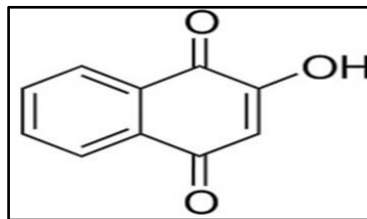


Figure 05: structure chimique des quinones (**Boulberhane et nabti, 2017**).

➤ **Propriétés**

- Elles sont des transporteurs d'électrons (plastoquinone et l'ubiquinone).
- Certains dérivés sont des anti appétants et toxiques (**Gilbert et Norris, 1968**).
- Effets antimicrobiens.

II.2.1.d. Les lignines

➤ **Définition**

C'est un polymère amorphe de nature phénolique liant les éléments du bois entre eux (**Merdaga, 1985**)(figure 06).

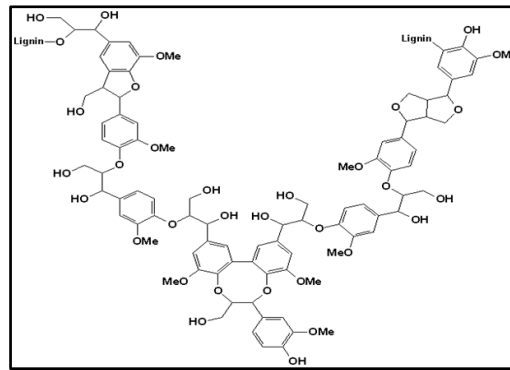


Figure 06: Structure d'une lignine (Wertz, 2010).

➤ Localisation

Les lignines se trouvent principalement dans les parois secondaires des cellules, les rendant rigides et imperméables (Wertz, 2010).

➤ Propriétés

- Dégradation difficile par les bactéries et champignons.
- La présence d'une fonction et d'une capacité d'échange cationique.

II.2.1.e. Les coumarines

➤ Définition

Les coumarines doivent leur nom de classe à "coumarou", nom vernaculaire de la fève tonka, à partir de laquelle la coumarine a été isolée en 1820 (Jain et Joshi, 2012) (figure 07). Elles sont classées en coumarines simples, prenylées, furanocoumarines et pyranocoumarines.

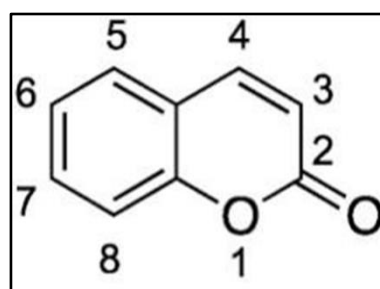


Figure 07: Structure de base des coumarines (Benkiki, 2006).

➤ Localisation

Les coumarines se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Deina *et al.*, 2003; Booth *et al.*, 2004).

➤ **Propriétés**

- Peut lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (phytoalexine).
- Utiliser en parfumerie (l'odeur de foin).
- Utiliser en cosmétologie (**Kansole, 2009**).
- Activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes et hypertensives.

II.2.1.f. Saponines

➤ **Définition**

Le nom saponine dérive du mot latin "*sapo*", qui signifie savon car ces composés moussent une fois agités avec de l'eau (**Vincken et al., 2007**). (figure 08).

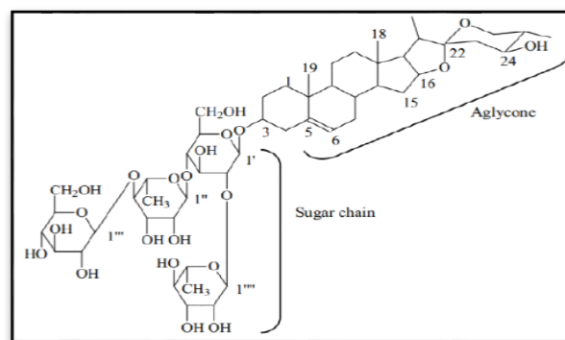


Figure 08: Structure d'une saponine (**Moghimpour et Handali, 2015**).

➤ **Localisation**

Les saponines se trouvent dans de très nombreuses plantes (dans les feuilles, le tronc, les fruits, les graines et les racines).

➤ **Propriétés**

- Propriétés physicochimiques: moussage, émulsification, solubilisation, douceur et amertume (**Kabera et al., 2014**).
- Propriétés biologiques: antioxydante, antimicrobienne, insecticide et hémolytique (**Kabera et al., 2014**).
- Action expectorante ce qui permet d'augmenter les sécrétions bronchiques (**Kabera et al., 2014**).
- Traitement des affections des voies respiratoires supérieures comme la toux et la bronchite.

II.2.2. Composé terpéniques

➤ Définition

Le terme terpénoïdes fait référence à un groupe de substances avec un squelette terpénique, une unité isoprène à 5 atomes de carbones (C₅H₈) dérivés de 2-méthylbutadiène (**Bakkali et al., 2008**). Ils sont classés selon le nombre d'unités isoprénoïdes: terpènes proprement dit (C₁₀), sesquiterpènes (C₁₅), diterpènes (C₂₀), triterpène (C₃₀), tétraterpènes (C₄₀), et polyterpènes (**Consolidated, 2009**) (figure 09).

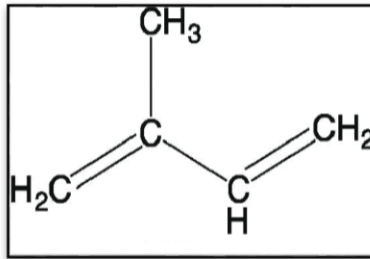


Figure 09: Structure d'isoprène (Site Web 02).

➤ Propriétés

- Protéger les plantes contre les agressions des champignons et autres bactéries (**Eurotext, 2002**).
- Propriétés thérapeutiques, notamment en cancérologie, dans le traitement de l'inflammation ou encre des infection bactériennes (**Souris et Delphine, 2015**).

II.2.3. Les alcaloïdes

➤ Définition

Les alcaloïdes, les substances organiques d'origine végétale les plus courantes, sont azotés, alcalins et possèdent des propriétés physiologiques remarquables à faible dose (**Zenk et Juenger, 2007**). Leur nom fait référence à leur propriétés alcalines ou basiques (**Buchanan et al., 2000**). (figure 10)

On distingue trois types d'alcaloïdes:

- Les pseudo-alcaloïdes: ne possèdent pas d'azote intra-cyclique.
- Les proto-alcaloïdes: l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique.
- Les alcaloïdes vrais: l'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle.

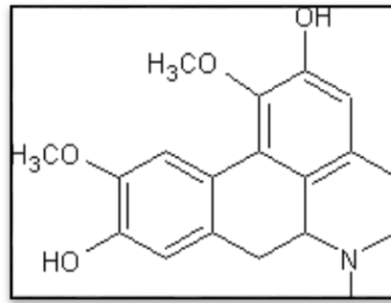


Figure 10: structure de base d'une alcaloïde (**Site Web 02**).

➤ **Localisation**

Les alcaloïdes se trouvent dans les tissus jaunes en phase de croissance et les tissus périphériques (cellules épidermiques et sous épidermiques des feuilles, téguments des graines et partie corticale des racines) (**Site Web 06**).

➤ **Propriétés**

- Elément défensifs contre les prédateurs (les mammifères) en raison de leur toxicité (**Hartmann, 1991**).
- A faible dose, activités analgésiques(morphine) , anesthésiques locaux (cocaïne) , antibactériennes et anti cancéreuses (**Hocquemiller et al., 1982**)

Chapitre III : Les activités biologiques.

III.1. Activité antioxydante

III.1.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par les systèmes de défense antioxydants (Favier, 2003). Ce déséquilibre se traduit par des dommages cellulaires et tissulaires souvent irréversibles

(Sore, 2004; Delattre *et al.*, 2005). Le stress oxydatif est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les attaques des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Bonfont-Rousselot et Colin, 2010).

III.1.2. Les radicaux libres

L'oxygène est essentiel à la vie des organismes aérobies. Les mitochondries utilisent la majeure partie de l'oxygène comme substrat de la chaîne respiratoire pour générer de l'énergie sous forme d'ATP. Ce mécanisme induit la production de substances réactives en équilibre avec le système antioxydant (Roede et Jones, 2010).

III.1.2.a. Définition

Un radical libre est défini comme toute molécule ou atome qui possède un ou plusieurs électrons non appariés, selon le phénomène d'oxydation il doit être combiné avec un autre électron pour atteindre la stabilité, améliorant ainsi sa réactivité (Mac Laren *et al.*, 2007).

III.1.2.b. Les types des radicaux libres

Parmi toutes les espèces de radicaux libres susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un groupe restreint de composés radicalaires jouant un rôle particulier dans la physiologie que l'on appelle les radicaux libres primaires

(Favier, 2003). D'autres ERO sont appelés radicaux secondaires (Nathalie, 2014) formés à partir de la réaction de radicaux primaires sur des composés cellulaires (Dwassy, 1987).

Il existe deux types de radicaux libres (tableau 02).

Tableau 02: Principales ERO radicalaires et non radicalaires (Halliwell, 2006).

Dérivé oxygéné radicalaire	Dérivé oxygéné non radicalaire
Radical superoxyde : $O_2\cdot$	Peroxyde d'hydrogène : H_2O_2
Radical hydroxyle : $OH\cdot$	Ion hypochlorite : $HOCl$
Peroxyle : $LO_2\cdot$	Ozone : O_3
Alkoxyde : $LO\cdot$	Oxygène singulet : O_2
Hydroperoxyde : $LOOH\cdot$	Peroxynitrite : $ONOO\cdot$
Radical monoxyde d'azote : $NO\cdot$	

III.1.2.c. Les sources des radicaux libres

On distingue deux groupes de forme réactive de l'oxygène (FOR) selon leur origine endogène ou exogène (**Dwassy, 1987**).

➤ Les sources endogènes

Les mitochondries sont la plus grande source endogène de production de radicaux libres (**Khelfallah, 2012**). Au cours de la défense antimicrobienne, les phagocytes activés par les réponses inflammatoires génèrent de grandes quantités de ROS (**Delattre et al., 2005**).

➤ Les sources exogènes

Des facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont également responsable de l'augmentation du stress oxydatif par accumulation de radicaux libres dans l'organisme (**Zerargui, 2015**) :

- Les rayonnements ultraviolet et ionisants sont responsables de la formation d'oxygène à l'état singulet (**Bouزيد, 2014**).
- L'âge: à mesure que nous vieillissons, les cellules deviennent moins actives et produisent donc plus d'FOR (**Nathalie, 2014**).
- Les métaux toxiques (chrome, vanadium) ainsi que le fer et le cuivre et certains composés phénoliques dans les aliments (**Valko et al., 2004**).
- Les antibiotiques anticancéreux comme les anthracyclines génèrent des radicaux libres ce qui va déterminer son mode d'action anticancéreux et sa toxicité (**Nathalie, 2014**).

III.1.2.d. Le rôle des radicaux libres

Les radicaux libres participent au mécanisme de contraction musculaire, ils agissent sur le couplage excitation-contraction au niveau des fibres musculaires (**Bouزيد, 2014**). De plus, ils jouent un rôle dans le processus de la réponse immunitaire (**Nathalie, 2014**). En fait, les radicaux libres induisent l'expression de nombreux gènes par des voies de signalisation impliquent les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (**Bouزيد, 2014**).

III.1.3. Antioxydant

III.1.3.a. Définition

Un antioxydant est défini comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à des faibles concentrations par rapport à ceux d'un substrat produits par les oxydants, les radicaux libre et les métabolites réactifs de l'oxygène, retardent ou empêchent l'oxydation de ce substrat (**Ben Chibane, 2013**).

III.1.3.b. Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants peuvent agir par différents mécanismes, notamment le don d'électrons, la chélation des ions métalliques, les co-antioxydants ou la régulation de l'expression des gènes (Krinsky, 1992). Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec des radicaux libres spécifiques (Van antwerprn, 2006).

III.1.3.c. Principaux antioxydants

➤ Les antioxydants non enzymatiques

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes manières lors de la régulation du stress oxydatif, en captant directement les espèces réactives de l'oxygène, en chélatant les métaux de transition comme le fer (empêchant la réaction de Fenton) ou en inhibant l'activité de certaines enzymes responsables de la génération du stress oxydatif comme la xanthine oxydase (Boussoualim, 2014). Les flavonols, fait partie des flavonoïdes sont connu par leur effet antioxydant très puissant.

➤ Acide phénolique

Le pouvoir antioxydant des acides phénoliques réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres (Ouerdane et Ramdani, 2007).

➤ Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant en molécules ou ions stables (Goudable et Favier, 1997).

➤ Tanins condensés

Les tanins réagissent comme antioxydants puisant contre les radicaux libres en les transformant en molécules stables (Boussoualim, 2014).

➤ Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique empêche l'oxydation des LDL par divers systèmes générateurs d'ERO (Boussoualim, 2014).

➤ Vitamine E

La vitamine E prévient l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO• (Yoshida *et al.*, 1993).

➤ Les antioxydants enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont des effets complémentaires sur

la cascade radicalaire aux niveaux de superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), conduisant finalement à la formation d'eau et d'hydrogène moléculaire (Manallah, 2012).

III.2. Activité antibactérienne

III.2.1. Les bactéries

III.2.1.a. Définition

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire, ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires (champignons, algues) (Lozniewski et Rabaud, 2010).

III.2.1.b. Formes

La forme des bactéries peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacille), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochète). Les détails de leur forme ne sont visibles qu'en microscope électronique (Lozniewski et Rabaud, 2010).

III.2.2. Les agents antibactériens

III.2.2.a. Définition

Un agent antibactérien est un facteur qui contrôle le développement d'une population bactérienne. Lorsqu'il crée un état qui inhibe temporairement la reproduction bactérienne, il est dit bactériostatique, et lorsqu'il détruit complètement les bactéries il est dit bactéricide (Hardy, 2002).

III.2.2.b. Classification

On distingue quatre catégories des agents antibactériens: agents naturels, agent chimio-thérapeutique, agents physiques et agents chimiques (Boussoualim, 2014).

❖ Agents antibactériens naturels

- Polyphénols
- ✓ Phénols simples et acide phénoliques

Ces substances présentent une toxicité importante pour les microorganismes en s'intercalant dans la bicouche membranaire pour modifier les propriétés physiques (Taylor, 2013). Il peut s'agir de l'inhibition de certaines enzymes par réaction avec des groupements sulfhydryles ou des interactions non spécifiques avec eux (Cowan, 1999; Pistelli et Giorgi, 2012).

✓ **Quinones**

Les protéines d'adhésion de surface, les polypeptides de la paroi cellulaire et les enzymes membranaires des cellules microbiennes peuvent être des cibles des quinones (**Cowan, 1999**).

✓ **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes exercent leurs effets via trois mécanismes ; l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, inhibition de la fonction des membranes cytoplasmiques et l'inhibition du métabolisme énergétique (**TimCushine et Lamb, 2005**).

✓ **Tanins**

Ils ont une capacité à bloquer la membrane cytoplasmique par l'inactivation des adhésines de surface, les enzymes et les protéines de transport membranaires (**Okuda, 2005**).

✓ **Alcaloïdes**

Le mécanisme d'action est attribué à sa capacité à intercaler l'ADN (**Boussoualim, 2014**).

➤ **Huiles essentielles**

Les principaux mécanismes et sites d'actions des différents constituant des huiles essentielles sont : l'altération de la paroi cellulaire, la dégradation de la membrane cytoplasmique, l'altération des protéines membranaires, la fuite de contenu cellulaire, la coagulation du cytoplasme et l'épuisement de la force de mouvement des protons (**Goetz et Ghdira, 2012**).

➤ **Polypeptides**

La plupart des peptides inhibiteurs de la croissance microbienne agissent en formant des canaux ioniques dans les membranes microbiennes ou en inhibant de manière compétitive l'adhérence des protéines microbiennes aux polysaccharides récepteurs des cellules hôtes (**Yong et al., 2006**).

❖ **Agents chimio-thérapeutiques (antibiotiques)**

- **Définition**

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétiques ou semi synthétiques (**Lavigne, 2007**). Ce sont des produits microbiens (ou leur dérivés) capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (**Prescott et al., 1995**).

- **Classification**

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur différents critères tels que leurs origines, leurs structures et leurs mécanismes d'action (**Perronne, 1999**).

Selon le mécanisme de destruction de la cellule bactérienne (**Pibiri, 2006**), on obtient :

- Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.
- Antibiotiques inhibant la synthèse de la membrane cytoplasmique.
- Antibiotiques inhibiteur de la synthèse protéique.
- Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques et de la synthèse de l'ADN.
- Antibiotiques agissant par inhibition compétitive.

Selon la famille chimique (**Cohen et Jacquot, 2001**), nous avons :

- Beta lactamines: Pénicillines et Céphalosporines.
- Aminosides: Streptomycines et gentamycines.
- Phénicolés: chloramphénicols et thiamphénicols.
- Cyclines: tétracyclines et doxycyclines.
- Macrolides et apparentés: érythromycines et oléandomycines.

Deuxième partie: Etude expérimentale.

Chapitre I : Matériel et méthodes.

L'étude expérimental a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie de l'université abbès Laghrour -Khenchela- en avril 2023 , Elle comprend:

- Préparation des deux extraits aqueux de la pelure de grenade., l'un par décoction et l'autre par infusion.
- Analyse qualitative des composés phytochimiques.
- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.
- Essai de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM).
- Etude des activités antioxydante et antibactérienne.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

Il est constitué de deux extrait aqueux par infusion (EAI) et par décoction (EAD) de la plante médicinale *Punica granatum* , récoltée pendant le mois Décembre 2022.La plante a été ensuite séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Après le séchage, elle a été broyée à l'aide d'un mortier pour l'obtention d'une poudre , cette dernière est conservée dans un flacon en verre bien hermétique jusqu'à son utilisation.

I.1.2. Souche bactérienne

Quartes souches bactériennes ont été utilisées pour évaluer le potentiel antibactérien *in vitro* de la pelure de grenade (Tableau 03)

Tableau 03: Souches utilisées dans l'activité antibactérienne.

Souche bactérienne	Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif
<i>Bacillus subtilis</i>	Positif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Négatif

I.1.3. Equipements et réactifs chimiques

Pour assurer cette étude on a besoin des équipements et réactifs chimiques (Tableaux 04 et 05).

Tableau 04: Matériel et appareillage utilisés.

Matériels	Appareillages
Spectrophotomètre (Spectrum SP-UV2005). - Chambre d'observation UV " 254-365 " (VILBER LOURMAT). - Bain Marie (nuve bath, MEMMERT). - Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT). - Agitateur magnétique (SCIOGEX). - Vortex(VELP). - Balance analytique (OHAUS). - Balance (KERN PCB). - Réfrigérateurs (Liebherr). - Evaporateur. - Autoclave (Raypa).	- Bécher. - Eprouvette graduée. - Pissette d'eau. - Ballon à fond rond. - Spatule. - Entonnoir. - Ballon à fond plat. - Burette graduée. - Fiole jaugée. - Tubes à essai +Support. - Flacons. - Pince. - Papier filtre. - Montier et pilon. - Pipette graduée. - Bec bunsen. - Micropipette. - Verre de montre. - Plaque CCM.

Tableau 05: Réactifs chimiques et solvants utilisés.

Réactifs chimiques et solvants	
- Hydroxyde d'ammonium NH_4OH . - Acide sulfurique H_2SO_4 . - Anhydride acétique $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$. - N.butanal $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$. - Acétone $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$. - Carbonate de Sodium NaCO_3 . - Ethyle Acétate $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$. - Réactif Wagner.	- Hydroxyde de sodium NaOH . - Chloroforme CCl_4 . - Acide acétique glacial AAG. - Méthanol CH_3OH . - Chlorure d'aluminium AlCl_3 . - Acide Formique CH_2O_2 . - Réactif Mayer. - Réactif de Folin.

- | | |
|------------------------|---------------------|
| - Solution de Fehling. | - DPPH Poudre. |
| - Albumine Bovine. | - Gélose de Muller. |
| - Gélose Nutritive. | - Eau distillé. |
| - Eau physiologique. | |

I.2. Méthodes

Dans cette étude nous avons suivi de différentes étapes pour la préparation de deux extraits (par décoction et par infusion), pour réaliser l'étude qualitative par le screening phytochimique, pour faire l'étude quantitative à travers le dosage des flavonoïdes et des polyphénols, aussi pour effectuer une chromatographie sur couche mince, et enfin l'évaluation *in vitro* des activités antioxydante et antibactérienne.

I.2.1. Préparation des extraits

I.2.1.a. Préparation de l'extrait aqueux par infusion (EAI)

La préparation de cet extrait consiste à macérer 30g de poudre végétale (feuilles) dans 300ml d'eau distillée, le macérât est homogénéisé pendant 30 min à une température de 50°C. Après filtration, le filtrat est évaporé à l'aide d'une étuve à 50°C.

I.2.1.b. Préparation de l'extrait aqueux par décoction (EAD)

Elle est basée sur la préparation d'une décoction, en introduisant 30g de la poudre végétale dans 300 ml d'eau distillée. Le tout est chauffé jusqu'à l'ébullition pendant 3h et réduction du volume initiale à 1/10. Après refroidissement et filtration, le filtrat récupéré est évaporé à 50°C dans une étuve (Souley, 2005)

I.2.2. Tests phytochimiques

Des études phytochimiques qualitatives peuvent détecter différentes familles chimiques présentes dans les extraits préparés par réactions de coloration de précipitation et d'observation à la lumière UV.

Chaque test a été appliqué aux deux extraits et répété trois fois pour vérifier l'exactitude des résultats.

I.2.2.a. Flavonoïdes : Test de Shinoda

Dans un bécher, nous avons trempé 10g de la poudre sèche dans 150 ml de HCl dilué (1%), recouvert le bécher par un parafilm et enveloppé dans un papier d'aluminium, et laissé pendant 24h sur un agitateur magnétique. Filtrer le mélange et procéder au test suivant: prélever 10 ml du filtrat et le rendre basique en ajoutant des gouttes de NH₄OH à

10%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure du tube à essai (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.b. Saponosides : Test de Mousse

Dans un tube à essai, ajuster le volume à 10 ml d'extrait et agiter le tube verticalement pendant 15s. Après repos pendant 15 min, une hauteur de mousse constante indique la présence de saponine, puis mesurer la hauteur de mousse résultante dans le tube (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.c. Tanins

Nous avons déterminé la présence d'acide tannique en plaçant 2ml de l'extrait dans un tube à essai et en ajoutant 0.5 ml de chlorure ferrique à 1% (FeCl_3). Un aspect vert foncé ou bleu-noir indique la présence de tanins (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.d. Quinone libre

Pour détecter la présence des quinones libres, dans un tube à essai, nous avons ajouté 0.5ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) dilué à 1% à 5ml d'extrait. Le jaune, le rouge ou le violet indique la présence de quinones libres (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.e. Coumarines : Fluorescences UV.

Pour détecter la fluorescence, deux tubes à essai ont été préparés. Dans le premier tube à essai 0.5ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) dilué à 10% a été introduit avec 1ml d'extrait. Dans le second, un extrait non traité avec NH_4OH a été préparé pour être utilisé comme témoin. Après le dépôt d'une goutte sur papier filtre, une forte fluorescence sous lumière UV (366nm) indique la présence des coumarines (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.f. 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. Le tout est incubé pendant 15 min. Si la couleur apparaît violette ou verte cela indique un test positif (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.g. Composés réducteurs

Dans un tube à essai, 1 ml de l'extrait a été introduit avec 2 ml de solution de Fehling (1ml de solution A et 1 ml de solution B), suivi d'une incubation dans un bain marie bouillant pendant 8 min. Un précipité rouge brique indique un test positif (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.h. Terpènes : Test de Salkowski

2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés à 5 ml de l'extrait. La formation de deux phases et l'apparition d'une couleur brune dans l'interphase indique la présence de terpénoïdes (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.i. Alcaloïdes

Des tests ont été effectués pour déterminer les alcaloïdes par des réactions de précipitations en présence de réactifs alcaloïdes (Meyer et Wagner). Dans un bécher, déposer des gouttes d'acide chlorhydrique à 1% dans 1 ml de la solution d'extraction ; puis diviser et répartir la solution en deux parties égales dans deux tubes à essai, ajouter 0.5 ml de réactif de Meyer dans le premier tube à essai et 0.5 ml de réactif de Wagner dans un second tube. La formation d'un précipité blanc et brun respectivement indiquant la présence d'alcaloïdes (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.2.j. Anthraquinone

Pour détecter la présence des anthraquinones, mélanger 5 ml de l'extrait avec 5 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) puis agiter. L'apparition d'une couleur violette indique un test positif (Harbone, 1998; Bruneton, 1999).

I.2.3. Essai de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse de l'extrait brut par CCM a permis de comprendre les différentes classes de composés contenus dans les deux extraits aqueux (Braithwaite et Smitn, 1999).

✓ Principe

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, pour l'isolement et l'identification des métabolites. Elle repose sur le phénomène d'adsorption et de partage, les molécules à séparer sont adsorbées à la surface de support (phase stationnaire) et entraînées à travers ce dernier par l'éluant (phase mobile), donc la séparation est en fonction de l'adsorption des composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et leurs différences de solubilité dans la phase mobile (Braithwaite et Smith, 1999).

✓ Mode opératoire

Le développement des plaques se produit dans des cuvettes en verre contenant les éluants appropriés. On utilise des plaques en silicone prêtes l'emploi avec des supports en aluminium. Les contrôles et les échantillons sont stockés dans de petits volumes (2-4 µl).

Tableau 06: Différents systèmes de solvants utilisés.

Systèmes	Solvant
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).

On place la plaque en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre ; elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5cm dans la phase mobile, qui est constituée d'un ou de plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide par appositions successives au moyen d'une micropipette en verre et éventuellement séché par ventilation sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Le déplacement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté, phase mobile et phase stationnaire.

✓ Révélation des plaques sous UV

Après développement et séchage dans une cellule de verre, observer la plaque sous lumière UV à 254 et 365nm. Les couleurs d'accompagnement ont été enregistrées avant et après visualisation sous lumière UV.

✓ Calcul du rapport frontal (Rf)

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est représenté par son rate factor ou rapport frontal (Rf), qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule et la distance parcourue par la phase mobile (front de solvant). Il peut donc être compris entre 0 et 1.

$$Rf = \frac{\text{La distance parcourue par le constituant}}{\text{La distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

I.2.4. Dosage des polyphénols totaux

✓ Principe

La méthode utilisée consiste à utiliser le réactif de Folin-Ciocalteu , qui est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique jaune (H3PW12O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMo12O40).Le principe de la méthode repose sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif ,elle conduit à la formation de nouveaux complexes bleus molybdène-tungstène.

La couleur obtenue absorbe au maximum entre 725 et 760nm est proportionnelle à la teneur en polyphénols présents dans l'extrait végétal (Boizot et Charpentier, 2006; Vermerris et Nicholson, 2006)(figure 11).

✓ **Mode opératoire**

Le dosage a été réalisé selon la méthode décrite par (Wong *et al.*, 2006).

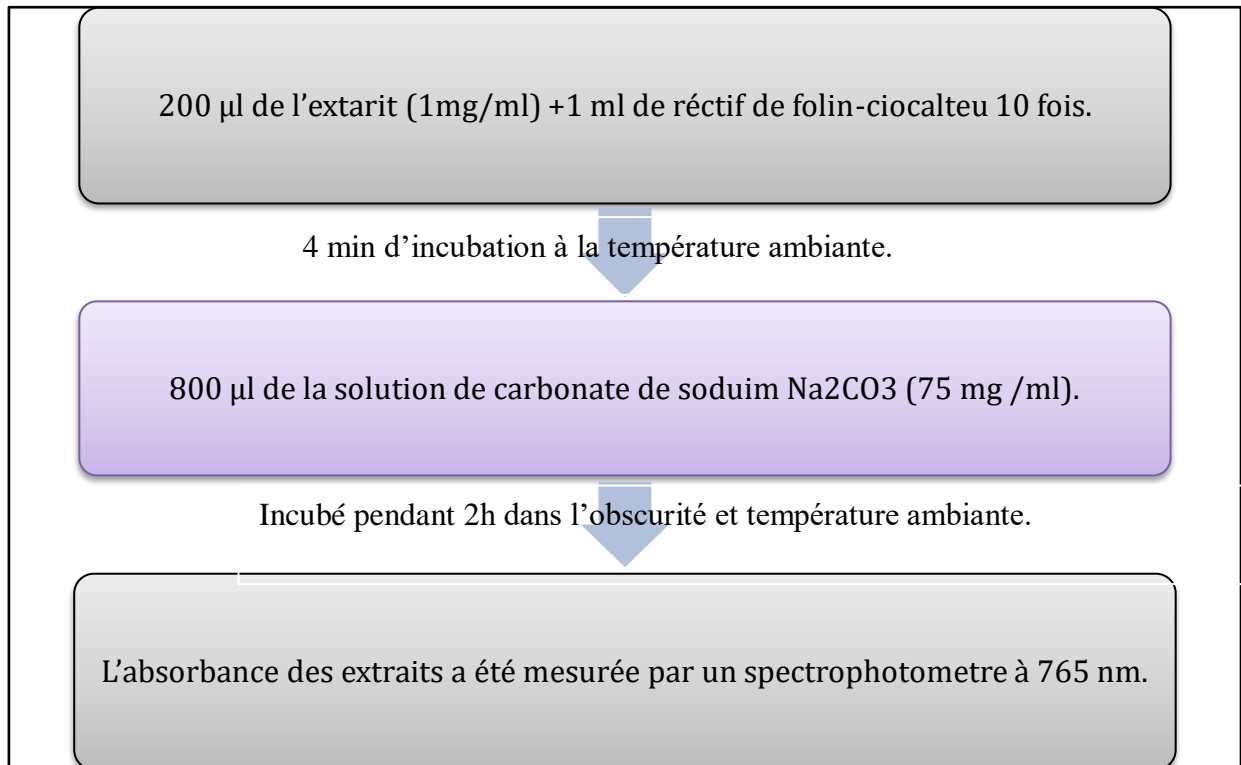


Figure 11: Mode opératoire de dosage des polyphénols (Wong *et al.*, 2006).

✓ **Expression des résultats**

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon : l'acide gallique et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG /mg).

I.2.5. Dosage des flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes dans l'EAI et l'EAD a été élaboré par la méthode colorimétrique de Dejdanne *et al* (2006).(figure 12)

✓ **Principe**

La méthode colorimétrique utilisée pour le dosage des flavonoïdes est basée sur la capacité de ces composés à former un complexe chromogénique avec le chlorure d'aluminium (AlCl₃), qui donne à la solution une couleur jaune pâle au maximum d'absorption et à la

longueur d'onde de 448nm , par rapport à ceux préparés dans les mêmes conditions. Le témoin a été comparé à la condition et ne contenait pas d'extrait de *Punica granatum*.

✓ Mode opératoire

Le protocole de dosage est présenté dans la figure 12.

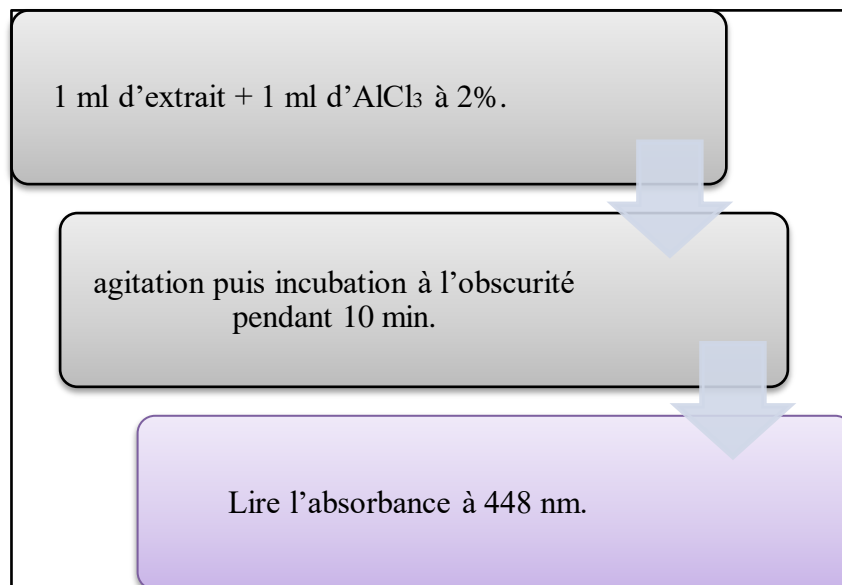


Figure 12: Mode opératoire de dosage des flavonoïdes (Dejdanne *et al.*, 2006).

✓ Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax + b$) réalisée par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/ mg}$).

I.2.6. Evaluation de l'activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre DPPH)

✓ Principe

Le radical 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008).

I.2.7. Evaluation de l'activité anti bactérienne(méthodes des disques)

Nous avons utilisé la technique de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri en adaptant la méthode de disque décrite par (Bauer *et al.*, 1966) pour connaître les composés antibactériens synthétisés par la plante médicinale *Punica granatum* .

✓ Préparation pré culture

➤ Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries.

➤ Stérilisation des matériels

L'eau distillé , les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 30min.

✓ Préparation de la suspension des souches de référence

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive. Après 18 h d'incubation à 37°C , des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0,5 Mc Farland (Annexes) et été préparés, pour chaque microorganisme dans 5 ml d'eau distillée stérile.

✓ Ensemencement

L'ensemencement est réalisé sur un milieu géloses Muller Hinton (MH) , coulées en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4mm (les géloses sont séchées avant l'emploi).

Les étapes de l'ensemencement sont :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur un paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois , en tournant la boîte de 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 .
- Une série de dilutions (1/1, 1/2, 1/4 et 1/8) de l'extrait aqueux dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est réalisée à partir d'une solution mère 200 mg préalablement dissouts dans un ml DMSO .

✓ Application des disques

L'application des disques au niveau des boîtes de pétri est réalisée en suivant les étapes suivantes:

- Des disques de papier filtre de 6,0mm de diamètre (Wattman n° 1) sont imprégnés individuellement avec 15 µl d'extrait à différentes concentrations.
- A l'aide d'une pince stérile on applique les disques à la surface des milieux déjàensemencés.
- Un disque de l'antibiotique (gentamycine 30 µl)est placé dans la boîte de pétri comme contrôle positif .
- Un disque imprégné de 5 µl de DMSO est utilisé comme témoin négatif .
- Chaque test est répété trois fois.
- Les boîtes sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20min , ensuite dans une étuve à 37 °C/24h .

✓ Lecture

La lecture se fait après 18 à 24h d'incubation à 37°C, l'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition de la croissance microbienne.

Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en mm incluant le diamètre du disque

Cette sensibilité est classée selon (**Ponce *et al.*, 2003**) comme suit:

- Non sensible pour un diamètre inférieur à 8mm.
- Sensible pour un diamètre de 9-14mm.
- Très sensible pour un diamètre de 15-19mm.
- Extrêmement sensible pour diamètre supérieur à 20mm.

✓ Expression des résultats

Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues ± l'écart type (SD).L'analyse des données a été effectuée par l'application du test t de Student , qui est basé sur la comparaison des moyennes deux à deux, entre l'extrait aqueux par infusion et l'extrait aqueux par décoction , en utilisant le logiciel MINITAB (Version 13.31) . Les différences sont considérées comme :

- 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 discussions.

II.1. Etude phytochimique

II.1.1. Rendements des extraits

✓ Résultat

Deux extraits aqueux, l'un par infusion (EAI) et l'autre par décoction (EAD) ont été préparés à partir de la poudre de la plante *Punica granatum*. Après l'extraction, le rendement des deux extraits est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 07: Le rendement des extraits de *Punica granatum*.

Les extraits	Le poids de matériel végétal en (g)	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
EAI	30g	12,38g	41,27%
EAD	30g	14,53g	48,43%

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{M_{\text{extrait brut (g)}}}{M_{\text{matériel végétal sèche (g)}}} \times 100$$

- **M_{extrait brut}** : masse en (g) de l'extrait brut.
- **M_{matériel végétal sèche}** : masse en (g) du matériel végétal sèche.

Les rendements représentés dans le tableau ci-dessus sont illustrés sous forme d'un histogramme permettant de faire une comparaison entre les rendements des différents extraits.

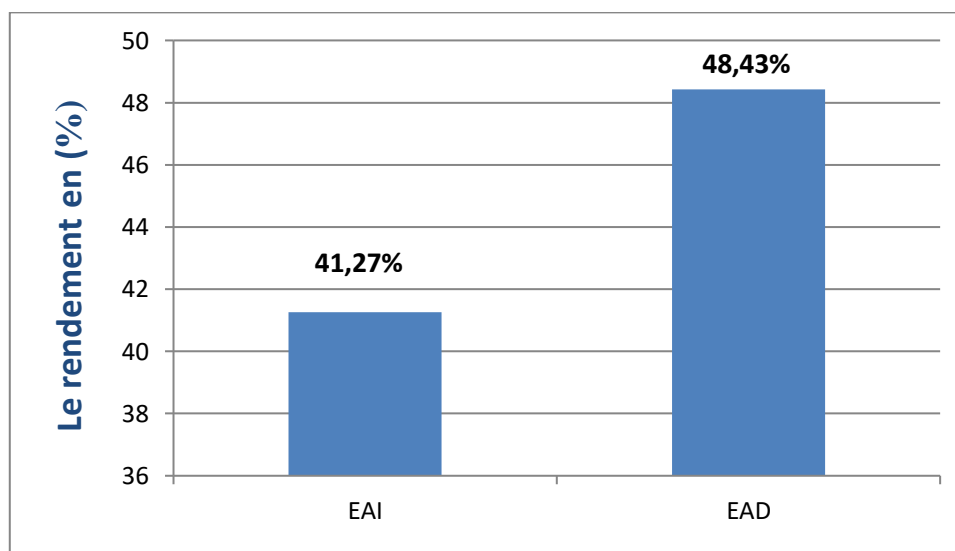


Figure 14: Rendement des deux extraits EAI et EAD du *Punica granatum*.

✓ Discussion

Le rendement de l'EAD est plus élevé (48,43%) que le rendement de l'EAI (41,27%). Le rendement n'est pas relatif ; il varie selon l'espèce végétale, l'organe utilisé pour

l'extraction , les conditions de séchage ,le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (Mohammedi , 2006).

II.1.2. Tests phytochimiques

✓ Résultat

L'évaluation de la composition phytochimique de la plante médicinale *Punica granatum* a permis de mettre en évidence la présence de quelques constituants chimiques. Les résultats de l'analyse phytochimiques des deux extraits (EAI) et (EAD) sont présentés dans le tableau 08 et les figures 15 et 16.

Tableau 08: Résultats des tests phytochimiques sur l'EAI et l'EAD.

Métabolites secondaires	Les extraits		Observation
	EAI	EAD	
Flavonoïdes	+++	+++	L'apparition d'une couleur jaune.
Tanins	+++	+++	Coloration verdâtre ou bleu noirâtre.
Coumarines	-	-	Pas d'une fluorescence intense .
Quinones libre	++	+++	L'apparition d'une couleur qui vire au jaune.
Anthraquinones	-	-	Absence d'une coloration violette.
Stérols et Triterpènes	-	-	Absence d'une couleur mauve, verte ou violette.
Terpénoïdes	++	++	Formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase.
Saponosides	+++	++	L'apparition d'une mousse.
Alcaloïdes	-	-	- Réactif de Mayer: Absence de formation d'un précipité blanc. -Réactif de Wagner: Absence de formation d'un précipité brun.
Composés réducteurs	+++	+++	L'apparition d'un précipité rouge-brique.

Les résultats sont interprétés comme suit :

- Test négatif : (-).

- Test faiblement positif: (+).
- Test positif : (++)
- Test fortement positif : (+++).



Composés réducteurs

Quinones libres

Tanins



Stérols et triterpènes

Anthraquinones

Figure 15: Quelques résultats des tests phytochimiques sur l'EAI.



Composés réducteurs

Quinones libres

Tanins



Stérols et triterpènes

Anthraquinones

Figure 16: Quelques résultats des tests phytochimiques sur l'EAD.

✓ **Discussion**

L'étude phytochimique des deux extraits (EAI et EAD) a montré une forte présence des flavonoïdes, des tanins et des composés réducteurs. Les Saponosides sont présents

en quantités plus élevées dans l'EAI par contre dans l'EAD sont présents en quantité faibles.

Les travaux de (Boulberhane et Nabti, 2017) ont démontré que les tanins isolés des plantes médicinales possèdent une activité toxique contre les champignons.

Cette étude a démontré qu'il y'a présence également des terpénoïdes mais en quantité faible dans les deux extraits. Les quinones libres sont présentes en quantités plus importante dans l'EAD que dans l'EAI. Les analyses qualitatives indiquent l'absence des coumarines, anthraquinones, alcaloïdes, stérols et triterpènes.

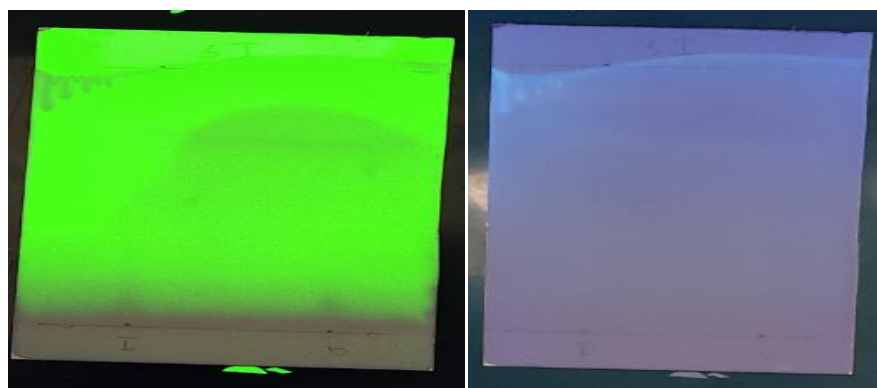
Les alcaloïdes sont dotés de propriétés pharmacologiques ettoxicologiques marquées alors que les composés phénoliques présentent une large gamme d'activités biologique (Bruneton, 2009;Ikan, 1991).

La différence de la composition chimique des mêmes plantes dans une autre région peut être expliquée par l'influence des facteurs sur la présence, l'absence et la répartition des différents principes actifs comme, le climat, la nature du sol, eau, altitude ...etc. (Boughrara, 2016).

Donc la plante médicinale *Punica granatum* présente une richesse en métabolites secondaires.

II.1.3. Résultats de l'étude qualitative par CCM

Pour les tests analytiques qualitatifs de la teneur en métabolites secondaires dans les extraits EAI et EAD, la (CCM) doit être utilisé ; car c'est l'une des méthodes courantes pour séparer et purifier divers composants des extraits des plantes et assez simple à mettre en évidence. L'identification des composés était basée sur la comparaison du Rf et de la couleur observée sous lumière UV pour les taches apparaissant sur la CCM. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 17 et 18 et 19 et le tableau 09.



(a)

(b)

Figure 17: Photos de chromatogramme résultant de l'analyse des deux extrait EAI et EAD par CCM sur gel de silice par le système de solvant 01 : (a) à 254nm et (b) à 365nm.

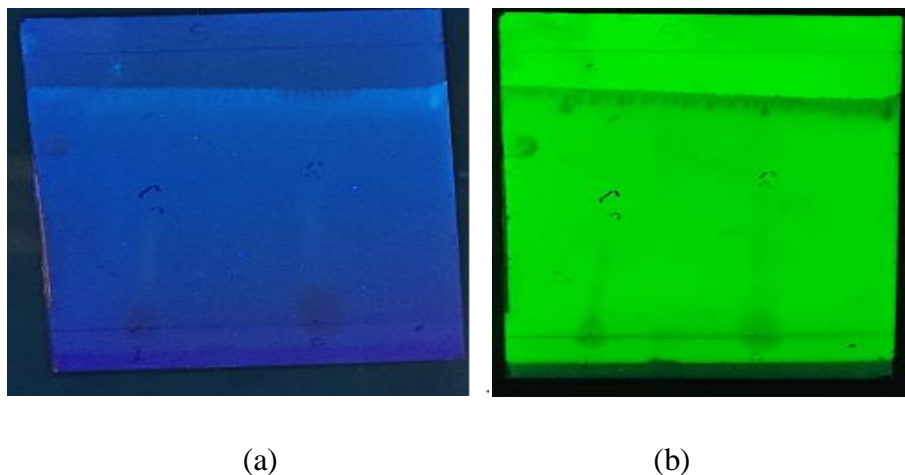


Figure 18:Photos de chromatogramme résultant de l'analyse des deux extrait EAI et EAD par CCM sur gel de silice par le système de solvant 02 : (a) à 254nm et (b) à 365nm.

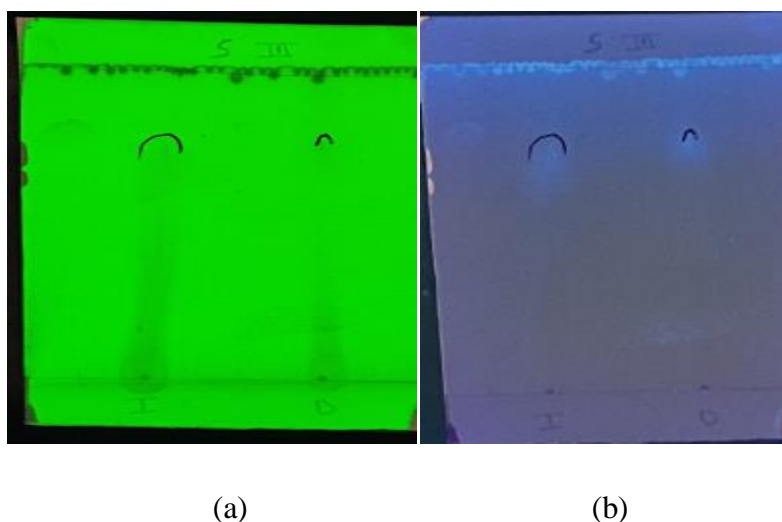


Figure 19:Photos de chromatogramme résultant de l'analyse des deux extrait EAI et EAD par CCM sur gel de silice par le système de solvant 03 : (a) à 254nm et (b) à 365nm.

Tableau 09: Résultats de la CCM de EAI et EAD par différents systèmes de solvant.

Systèmes	Extraits	Spots	Couleur sous UV 254 (nm)	Couleur sous UV 365 (nm)	Rf (cm)
01	EAI	1	Marron foncé	Jaune verte	0,57

	EAD	1	Marron foncé	Jaune verte	0,53
02	EAI	1	Marron clair	Jaune	0,5
	EAD	1	Marron clair	Jaune verte	0,57
03	EAI	1	Marron clair	Bleu	0,75
	EAD	1	Marron clair	Bleu	0,76

$$\text{Rapport frontal (Rf)} = \frac{d}{D}$$

d : Distance parcourue par le constituant.

D: Distance parcourue par le front de l'éluant(D = 8cm).

✓ Discussion

Pour l'EAI nous avons noté un seul spot pour les trois systèmes. La couleur révélée sous la lampe UV 254nm est marron foncé pour le système 01(Ethyle acétate/acide formique/AAG/eau (25:3:3:7 v/v).) et marron clair pour le système 02 (n-butanol/eau/acide acétique glacial (4:5:1 v/v).) et système 03(Chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau(16:8:3:2 v/v).).La couleur révélé sous une lampe UV365nm est jaune verte pour le système 01 et jaune pour le système 01 et bleu pour le système 03.

Pour l'EAD nous avons remarqué un seul spot pour les trois systèmes. La couleur révélée sous une lampe UV 254nm et 365nm est la même que pour l'EAI pour le système 01 et le système 03, alors que pour le système 02 on observe une couleur jaune verte (UV 365 nm).Dans les deux extraits (EAI et EAD), le rapport frontal pour le système 03 est plus élevé que celui deux autres systèmes 01 et 02. Donc le système 03 a donné une meilleure séparation des deux extrait (EAI et EAD).La CCM nous permet de contrôler la qualité de l'extrait, même si elle est insuffisante pour identifier des composants spécifiques. Elle permet d'obtenir des informations utiles sur les éléments constitutifs de l'extrait (fluorescence, chromogénicité et facteurs de rétention).

II.1.4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage a été réalisé selon la méthode décrite par Wong *et al* en 2006.Les résultats obtenus sont exprimés en µg équivalant d'acide gallique par

milligramme de la matière végétale sèche ($\mu\text{g EAG/ mg}$), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

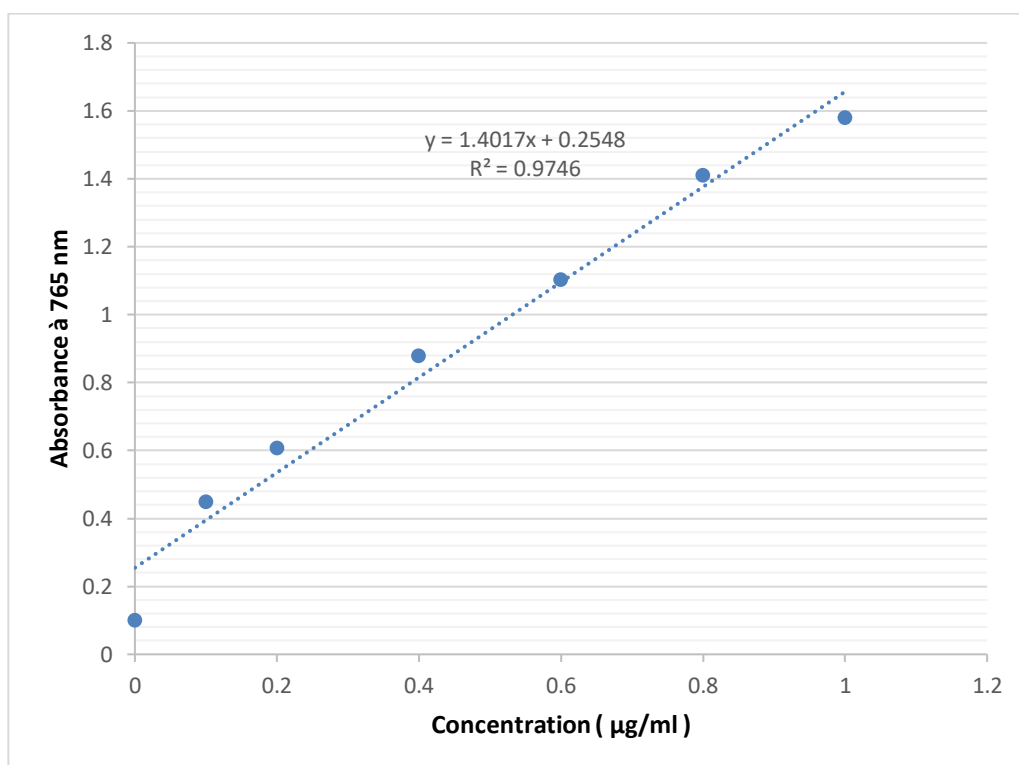


Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

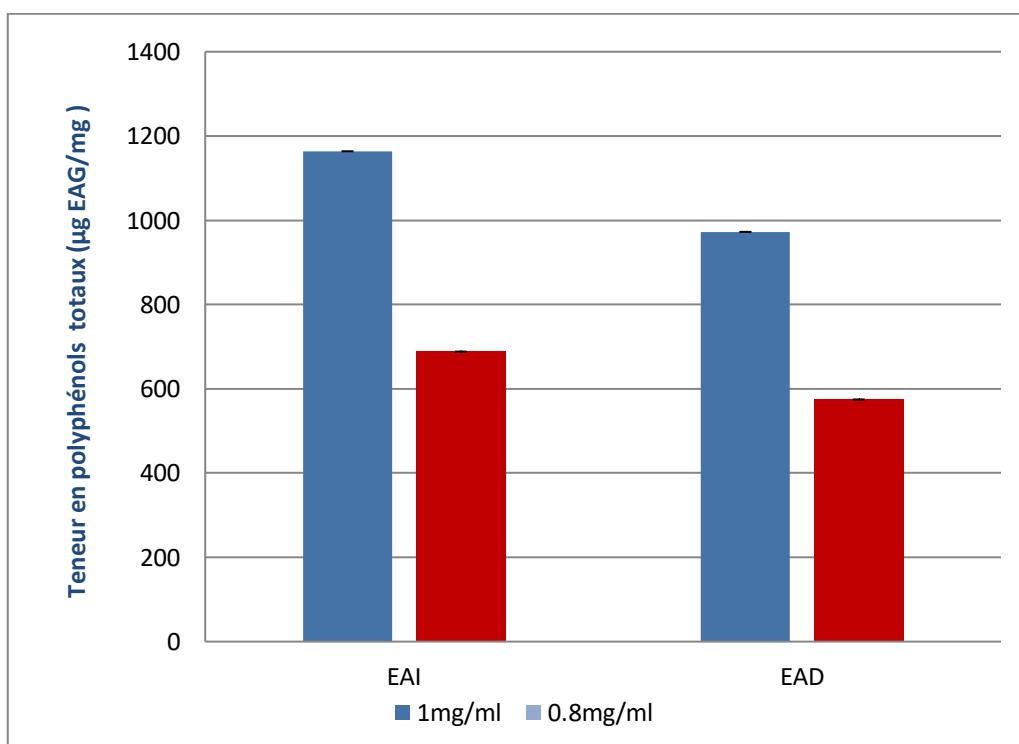


Figure 21: Teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg}$).

Tableau 10: Teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g EQ/mg E}$) des deux extraits **EAI** et **EAD**.

Extraits		Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg d'extract}$)
EAI	1 mg/ml	1163.76 \pm 18
	0.8mg/ml	688.43 \pm 11
EAD	1mg/ml	972.47 \pm 6
	0.8mg/ml	574.8 \pm 3

✓ Discussion

D'après les résultats présentés dans les figures 20 et 21 et le tableau 10, on peut constater que, pour les deux concentrations (1mg/ml et 0.8mg/ml)l'EAI possède une teneur plus élevée en polyphénols par rapport à l'EAD, avec un taux de 1163.76 \pm 18 $\mu\text{g EAG/mg d'EAI}$ (1mg/ml) et 688.43 \pm 11 $\mu\text{g EAG/mg d'EAI}$ (0.8mg/ml), et un taux de 972.47 \pm 6 $\mu\text{g EAG/mg d'EAD}$ (1mg/ml) et 574.8 \pm 3 $\mu\text{g EAG/mg d'EAI}$ (0.8mg/ml).

Le groupe des composés phénoliques est l'un des groupes ubiquitaires le plus largement distribués chez les végétaux et les antioxydants extraits des plantes sont en majeure partie des composés phénoliques dont les flavonoïdes, les tannins et les acides phénols (Poblocka- Olech *et al.*, 2016).

II.1.5. Dosage des flavonoïdes

L'étude quantitative de l'EAI et l'EAD de la plante *Punica granatum* au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage a été tracé pour cet objectif , établie avec la quercétine à différentes concentrations. Des mesures de densité optique pour chaque extrait ont été réalisées à 448nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent microgrammes de quercétine par milligramme d'extrait et déterminés par l'équation de type : $y=ax+b$.

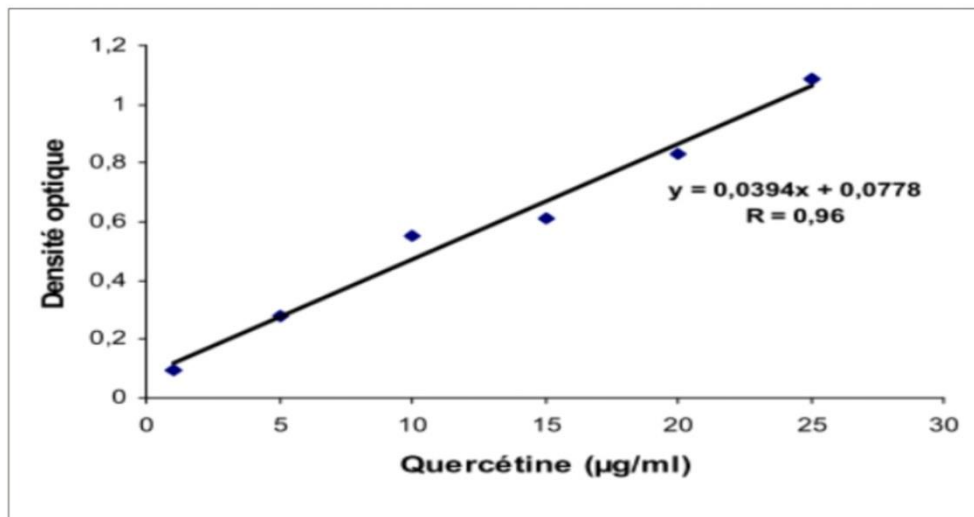


Figure 22: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

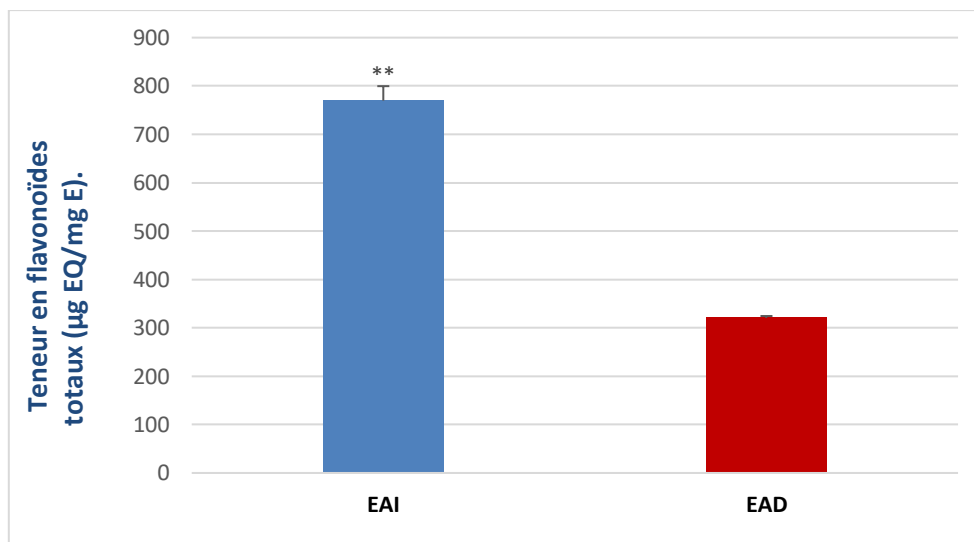


Figure 23: Teneur en flavonoïdes totaux (µg EQ/mg E).

Tableau 11: Teneur en flavonoïdes totaux (µg EQ/mg E) des deux extraits EAI et EAD.

Extraits	Flavonoïdes totaux (µg EQ/mg d'extrait)
EAI	769.68±30
EAD	320.44±4

✓ Discussion

D'après les résultats présentés dans les figure 22 et 23 et le tableau 11, on peut constater que l'EAI possède une teneur plus élevée en flavonoïdes par rapport à l'EAD, avec un taux de 769.68±30µg EAG/mg pour EAI et 320.44±4µg EAG/mg pour EAD.

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante (Benhamou, 1998).

II.2. Evaluation de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des extraits de la plante est mise en évidence par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, dans le but de déterminer les concentrations d'inhibition du radical DPPH.

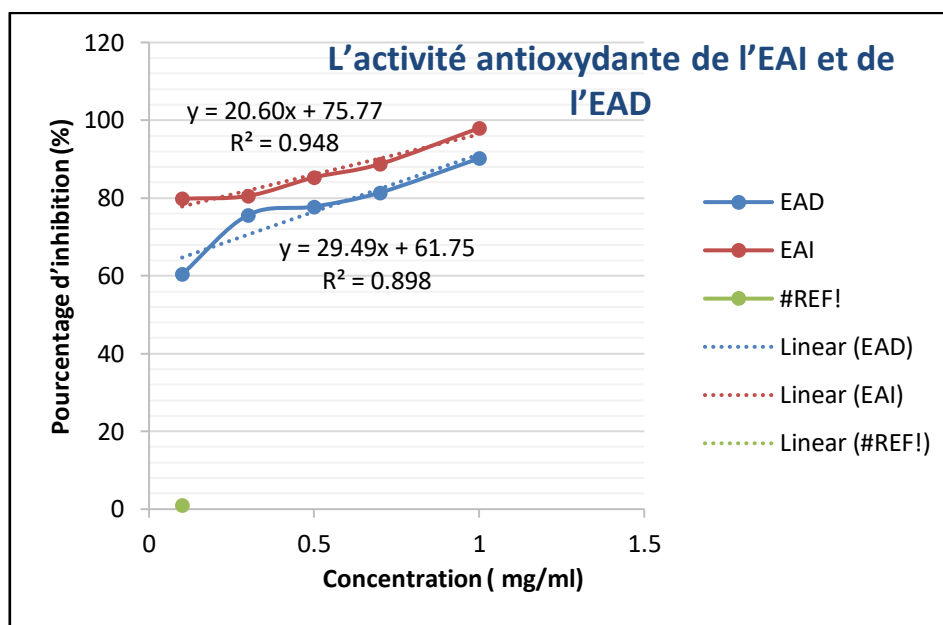


Figure 24: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonctions des différentes concentrations de l'EAI et de l'EAD.

Tableau 12: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les deux extraits (EAI) et (EAD) du *Punica granatum*.

Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition (%)	
	EAD	EAI
1	90.20±4.68	97.98±0.64
0.7	81.41±8.99	88.76±5.47
0.5	77.80±10.81	85.30±6.81
0.3	75.64±11.81	80.54±9.58
0.1	60.37±19.38	79.82±9.60

✓ Discussion

D'après le tableau ci-dessus et l'analyse par le test t de Student, nos résultats ont montré que l'EAI présente un I% (Pourcentage d'inhibition) plus élevé que l'EAD dans les différentes concentrations. A la grande concentration (1 mg/ml) pour l'EAI (I%=97.98±0.64) est élevé par rapport à l'EAD (PI%=90.20±4.68). A la concentration (0.7mg/ml) pour l'EAI (PI%=88.76±5.47) est élevé par rapport à l'EAD (PI%=81.41±8.99).

A la concentration (0.5mg/ml) pour l'EAI (PI%=85.30±6.81) est élevé par rapport à l'EAD (PI%=77.80±10.81).

A la concentration (0.3mg/ml) pour l'EAI (PI%=80.54±9.58) est élevé par rapport à l'EAD (PI%=75.64±11.81).

A la faible concentration (0.1mg/ml) pour l'EAI (PI%=79.82±9.60) est élevé par rapport à l'EAD (PI%=60.37±19.38)

Donc l'EAI de la plante médicinale *Punica granatum* possède un grand potentiel antioxydant par rapport à l'EAD. Cette grande activité antioxydante de l'EAI peut être expliquée par leur forte teneur en flavonoïdes et polyphénols qui sont considérés comme d'excellents antioxydants.

Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (**Oyaiza, 1986; Soares et al., 1997**).

L'effet antioxydant en piégeant le radical DPPH. est attribué soit à la capacité de libération d'hydrogène ou au transfert d'électrons par les composés antioxydants (**Popovici et al., 2009; Ghasemi et al., 2014**).

II.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé. La méthode de disque permet de déterminer l'action des extraits sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait, comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 13 et les figures 25 et 26 et 27 et 28.

Tableau 13: Résultats de diamètre des zones d'inhibition de croissance bactérienne .

Souches	Diamètre de zone d'inhibition			
	EAI 300mg/ml	EAD 300mg/ml	EAI 400mg/ml	EAD 400mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	17.67±2.05(++)	15±0.81(++)	21.67±1.69(+++)	19.67±1.24(++)
<i>Bacillus subtilis</i>	10.67±3.09(++)	16.33±1.24(++)	13±0.81(+)	15±0.81(+++)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.33±1.24(+)	13.67±1.24(+)	11±0.81(+)	14±0.81(+)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	14.67±1.24(+)	20.33±1.24(+++)	18.33±1.24(++)	21±0.81(+++)

Si le diamètre da zone d'inhibition(**D**) :

- **D** < 8mm : Souche résistante (-)
- $9 \leq \mathbf{D} \leq 14\text{mm}$: Souche sensible (+)
- $15\text{mm} \leq \mathbf{D} \leq 19\text{mm}$: Souche très sensible (++)
- **D** > 20mm : Souche extrêmement sensible (+++)

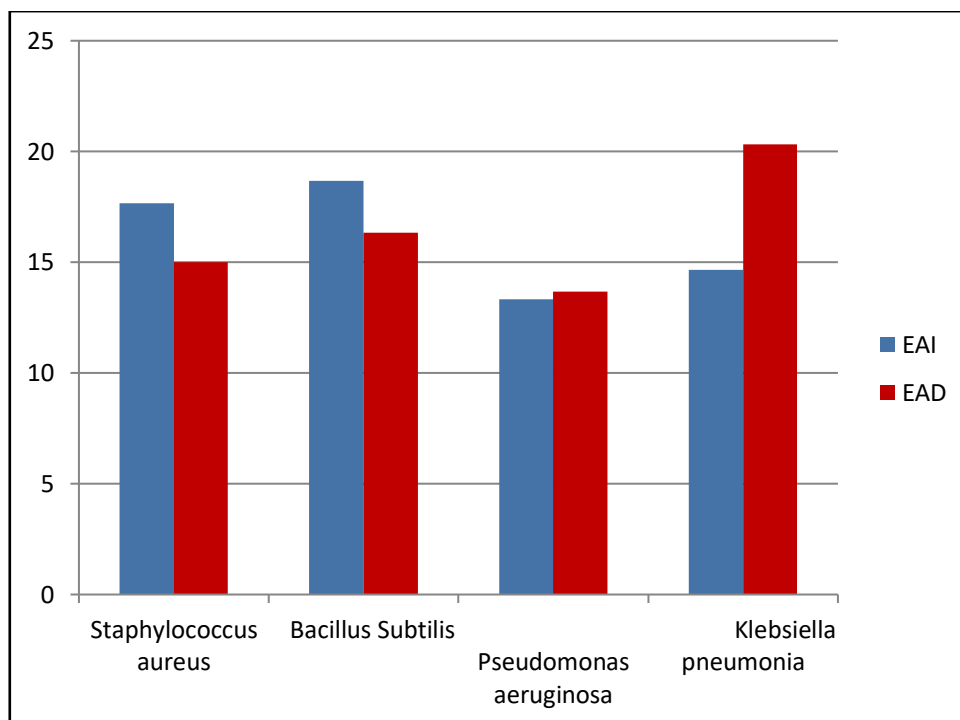


Figure 25: Répartition graphique de l'activité antibactérienne pour une concentration 300mg/ml des deux extraits EAI et EAD.

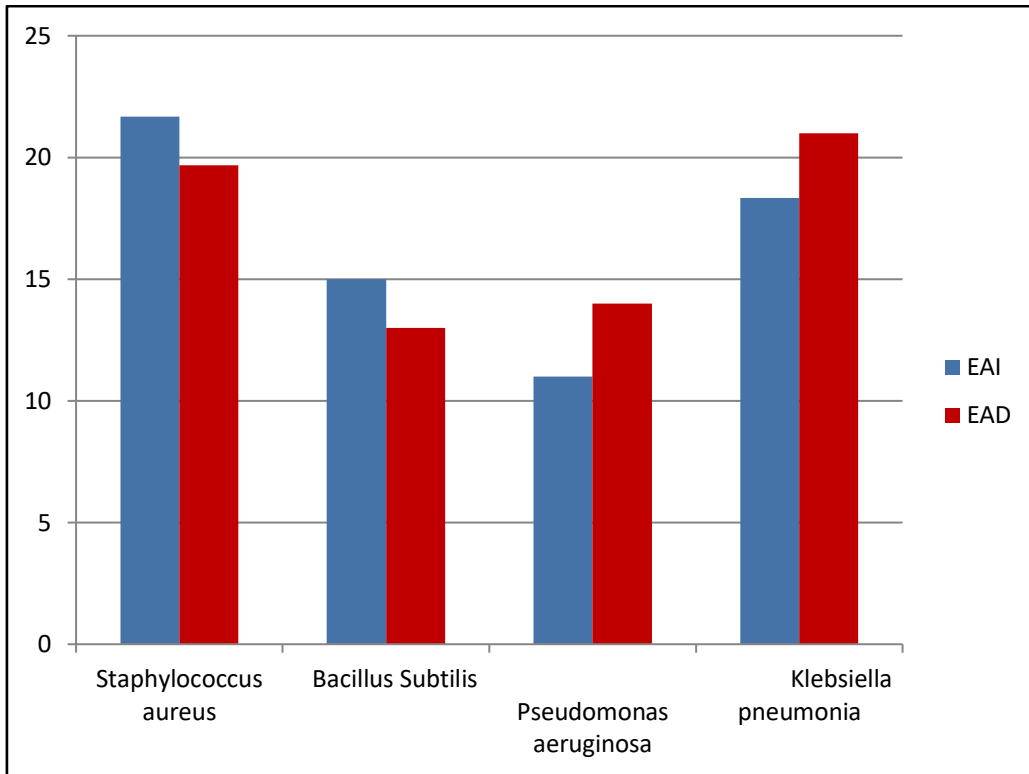


Figure 26:Répartition graphique de l'activité antibactérienne pour une concentration 400mg/ml des deux extraits EAI et EAD.



Figure 27:Résultats de l'activité antibactérienne de l'EAI.

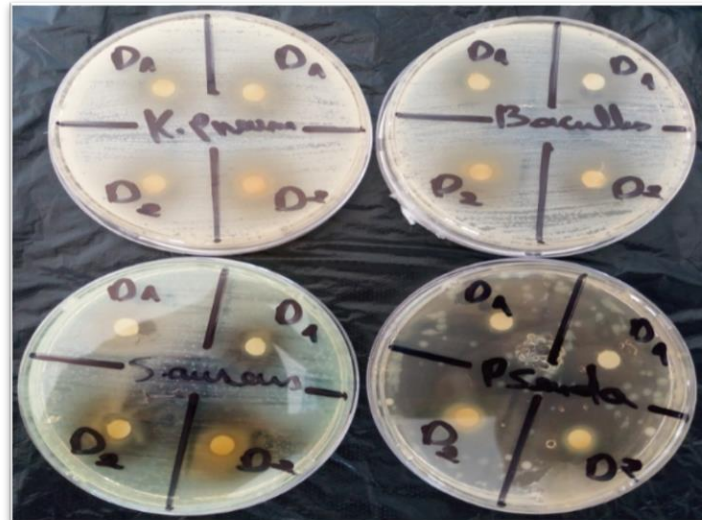


Figure 28:Résultats de l'activité antibactérienne de l'EAD.

✓ Discussion

Les mesures des zones d'inhibitions sont représentées dans le tableau qui nous révèlent que les deux extraits de la plante étudiée sont réagis avec les quatre souches . Nos résultats illustrés par la figure , indiquent que pour une concentration de 300mg/ml ou bien 400mg/ml , les deux souches " *S aureus* " et " *K pneumonia* " sont plus sensibles de façon très hautement significatives dans les deux extraits EAI et EAD que les deux autres souches " *B Subtilis* " et " *pseudo aeruginosa* ". Les deux souches " *S aureus* " et " *B Subtilis* " sont plus sensibles dans l'EAI que dans l'EAD. Les deux autres souches " *K pneumonia* " et " *pseudo aeruginosa* " sont plus sensibles dans l'EAD.

La sensibilité des souches utilisées traduit l'action antibactérienne des flavonoïdes , elle est en relation avec le nombre des hydroxyles libres (Zeghad, 2009).Les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus(Cowan, 1999).

Notre extrait aqueux est constituée principalement des flavonoïdes, qui sont théoriquement pourraient exercer des effets antibactériens important puisqu'ils sont des inhibiteurs puissants *in vitro* de l'ADN gyrase (Akroum, 2011 ; Madjour, 2014).

donc l'ADN est incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement, donc les mécanismes de résistance qui reposant sur différent facteur génétique devenu inactive (Paulette *et al.*, 1998; Akroum, 2011).

Conclusion

Les plantes médicinales jouent un rôle important dans la vie humaine. D'une part elles constituent une source alimentaire majeure et d'autre part ces plantes sont largement utilisées dans le traitement et la prévention des maladies, notamment dans les pays en développement.

La recherche scientifique montre qu'en plus des effets nutritionnels, les aliments naturels ont également d'importantes activités médicinales. Manger des aliments fonctionnels peut prévenir de nombreuses maladies et éduquer les gens sur ces avantages peut encourager les gens à consommer ces aliments en raison de leurs bienfaits pour la santé.

Ce fruit peut améliorer la santé. Ces effets physiologiques bénéfiques peuvent également avoir des applications préventives dans diverses pathologies.

Les avantages pour la santé de la grenade sont attribués à son large spectre de composés phytochimiques, principalement des polyphénols, comprenant principalement des tanins hydrolysables, des flavonoïdes et d'autres polyphénols.

La teneur en antioxydants et les avantages potentiels pour la santé associés à la consommation de grenades et de produits à base de grenade ont entraîné une augmentation de la demande des consommateurs pour cette culture, ce qui en fait une culture de grande valeur.

La pelure de grenade contient une grande quantité de composés phénoliques, ce qui en fait une source importante de substances actives, qui peuvent être utilisées dans l'alimentation, les cosmétiques, la médecine et d'autres domaines.

Enfin, du point de vue de la recherche sur les propriétés biologiques de la grenade, il peut être intéressant d'envisager de nouvelles molécules naturelles liées à l'activité antioxydante et antibactérienne, qui pourraient être utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour augmenter l'efficacité des antibiotiques.

Références bibliographiques

A

Abbasi H., Rezaei K. et Rashid L. (2008). Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO₂. *J Am Oil Chem Soc*, 85: 83–89.

Akroum S. (2011). Étude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de doctorat en sciences. Université Mentouri de Constantine. 18 p.

Alibert G., Rangiva R., Boudet M.A. (1997). Organisation subcellulaire : voies de synthèse des composés phénoliques ; *Physiol.* 15 : 279-301.

Aviram, M.; Dornfeld, L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure-Atherosclerosis: 195-198.

B

Barthel C., 2021. Contribution à la connaissance des pharmacopées traditionnelles : biodisponibilité des substances naturelles et influence des saponosides. Thèse de Doctorat : Chimie des Substances Naturelles . Université de Reims Champagne-Ardenne, 202p.

Ben Chibane T. (2013). Détermination de l'activité antioxydante de deux céréales : blé dur et blé tendre. Mémoire d'Ingénieur d'Etat. Option contrôle de qualité et analyse. Université de Bejaia, Algérie. p39 .

Benghanou M., 2012. La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire Professionnel : infirmier de la sante publique. institut de formation paramédical Chettia , 65p .

Benhamou J.P. (1998). *Hépatologie Clinique*. Flammarion. Paris. 566:597.

Benkiki N. (2006). Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat en chimie. Université El- Hadj lakhdhar-Batna-Algérie. 18p.

Boizot N., Charpentier J-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. *Le cahier des Techniques de l'Inra*. p79-82.

Bonnefont-Rousselot, D., & Collin , F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*.2010 ; 278(1), 55-67.Bouhadjra

Références bibliographiques

Keltoum; 2005. contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes .Oudneya africana R.Br. et Aristida pungens L. Diplome de doctorat chimie organique appliquée.

Booth N.L., Dejan N., Richard B., Stoci E. (2004). New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 50 : 120-123.

Botineau M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. P 661.

Bouakrif N. (2016). Qui fait quoi. SIPHAL : salon international de la pharmacie. 10^e édition. Safax-Algerie. 14p.

Boughrara B. (2016). Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêt thérapeutiques et nutritif de parc nationale El-kala. Thèse de doctorat : phytochimie. Université Badji Mokhtar- Annaba. 136p.

Boulberhane S., Nabti H. (2017). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des deux plantes : *Artemisia compestris L.* et *Ephedra alata alenda staph.* Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine-Algérie. p24, 69.

Boussoualim N. (2014). Activités biologiques de plantes médicinales : *Anchusa azurea Mill.* et *Globularia alypum L.* Thèse de Doctorat en microbiologie. Université Farhet Abbes Sétif 1-Algérie. p 115 .

Bousta D., Ennabili A. (2011). L'Institut national des plantes médicinales et aromatiques au service du développement de la phytothérapie au Maroc. 9 : p298-303.

Bouzid.M.A.(2014). Exercice physique, marqueurs antioxydants et peroxydation lipidique : effets de l'âge et du niveau d'aptitude physique. Université de Lile 2 Droit-Santé, p 11-24.

Bouzouita K. (2016). Phytovigilance : enquête auprès des pharmaciens officinaux d'Oujda. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed v-Rabat, Maroc. 23p.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igetic R. (2008). Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum L.*, Alliaceae). *Food Chemistry* ; 111(4) : 925-929.

Braithwaite A., Smith FJ. (1999). *Chromatographic Methods*. 5^e ème Ed Kluwer Academic Publishers. London. 548 p.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3^eème éd) Tec&Doc, Paris.

Bruneton J. (2010). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (5^e ed).

Références bibliographiques

Buchanan B., Gruissem W., Jone R. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plant. American Society of Plant Physiologists. 1250-1318.

Burks A W., Holgate S T., O'Hehir R E., Bacharier L B., Broide D H., Hershey G K K., & Peebles R S., 2020. Middleton's allergy E-Book: principles and practice. 9th edition. Elsevier, Amsterdam, 1840p.

C

Cauchard P. (2013). La grenade : Organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement. Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage. France : Université Angers, 56 p.

Cohen Y., Jacquot C. (2001). Pharmacologie. 5 ème Ed. Masson. Paris. 350p.

Cowan M.M. (1999). plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology review* 12(4). p564

D

Dean, F.M., 1963. Natural occurring Oxygen Ring Compounds. Butterworths. Londres. Pp 148.

Debuigne G., Cauplan F. (2013). Larousse des plantes qui guérissent: 500 plantes et leurs remèdes. Ed. Larousse.

Deina M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L. (2003). Natural product: their chemistry and biological significance. *Journal of the American Oil Chemistry Society.* 80:65- 70.

Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Radicaux libre et stress oxydant, aspects biologiques et pathologique. P 1-23.

Desjardins, Y., 2008. Physiological and ecological functions and biosynthesis of health-promoting compounds in fruit and vegetables (Tomas-Barberan and Gil). Dans: *Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products*, Woodhead Publishing, Cambridge, Angleterre, pp.1-64.

Ducourthial G. (2003) - Flore magique et astrologique de l'Antiquité. Editions Belin.

Dursus C., 2018. La gemmothérapie appliquée aux pathologies ostéo-articulaires fréquemment rencontrées à l'officine. Thèse de Doctorat : Sciences pharmaceutiques. Université de Bordeaux , 103p

Références bibliographiques

Dwassy.A .(1987). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Université Mohammed V-Souissi- Rabat, p 14- 42

E

Eurotext J.L. (2002). Progrès en Dermato- Allergologie

F

Favier A. (2003). Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité chimique. 108-117.

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

G

Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. 4 : 162-169.

Gilbert B.L., Norris D.M. (1968). A chemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees. J. Insect physiol. 14 : 1063-1068.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant capacity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J. Agric. Food Chem. 48 (10), 4581-4589.

GODET J. (1991) - Arbres et arbustes aux quatre saisons - . Les guides pratiques du naturaliste . Editions Delachaux et Niestlé.

Goetz P et Ghedira K. (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. Dans: Phytothérapie anti-infectieuse. Collection phytothérapie pratique. Springer Verlag, France. p193 **Guignard, J.L., Potier, P., 2000.** Biochimie Végétale. Dunod. Paris.

Goudable A et Favier D. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique et Métabolisme. p5-11.

Guignard, J.L., 1996. Abrégé de biochimie végétale. Ed. Masson. Paris. 160 p.

H

Halder D., Barik B B., Dasgupta R K., Saumendu D., (2018). Aroma therapy: An art of healing . *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*, 17 :p.1540-1558.

Halliwell .B . (2006). The antioxidant paradox : less paradoxical now. *Clin pharmacol*, p

Références bibliographiques

37-44.

Harbone J. (1998). Phytochemical Methods: A guide to moderne techniques of plant analysis 3eme Ed.: chapman and hill: 303.

Hardy S.P. (2002). Human microbiology. Taylor and Francis.p257

Hemingway, R.W., 1992. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : Lplant polyphenols: synthesis, properties, significande. Hemingway R W, Laks P. E. New York.

Holland,D.,Hatib,K.,Bar-Ya'akov,I.,2009.Pomegrenate bptany.Horticulture.breeding. Horticultural Reviews.35,127-191.

I

Ikan R. (1991). Natural Products: a laboratory guide. Academic Press (2e Ed.), pp 357.

J

Jain P.K., Joshi H. (2012). Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 02 (06): 236-240.

K

Kabera J.N., Semana E., Mussa A.R. Xin H. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology vol 7(2) : 377-392.

Kansole M. (2009). Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de Leucasmartinicansis(Jacquin).

Kamou O., Benhadj K., 2018. Étude de la phytothérapie traditionnelle dans la région de Fenoughil. Mémoire de Master 2 : Système de production Agro-écologique. Université Ahmed Draia-Adrar, 41p.

Kim H S., 2021. Complementary and Integrative Health. *in Pain Care Essentials and Innovations* , p.113-121.

Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*1992; 200:248-54.

L

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

Références bibliographiques

- Lardry J M., Haberkorn V., 2007.** L'aromathérapie et les huiles essentielles kinésithérapie, La revue , 7:p.14-17
- Lavigne J.P. (2007).** Effet des antibioques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- Lloyd I., 2009.** The Energetics of Health :a Naturopathic Assessment. 1^{er} édition , Elsevier Health Sciences , Markham, Ontario , Canada , 266p.
- Lozniewski A., Rabaud C., Nancy C. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques.Infections associées aux soins .CCLIN Sud-Est.

M

- Macheix J.A., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed, presses polytechnique universitaires romandes, Italie. 6 p.
- Mac Laren D. (2007).** Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8.Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier
- Madjour S. (2014).** Etude pharmacologique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *Rosmarinus officinalis*. Master en Chimie pharmaceutique. Université Med Khider-Biskra. 51 p.
- Manallah A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europea L.* Mémoire de Magister. Option biochimie appliquée. Université Farhat Abbas-Sétif-Algérie.
- Mardaga P. (1985).** La forêt wallonne. Bruxelles-Belgique. p 174.
- Medic-Sanic, M., Jasprica, I., Smolcic-Bubalo, A., Mornar, A., 2004.** Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica chemica acta.* 361-366 p.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D., Bartual, J., Saura, D., Martí, N., 2011.** Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Spain. *J. Sci. Food Agric.* 91, 1893–1906.
- Middelton Jr.E., Kardasnam C. (1993).** The flavonoides, advances in research since. ed.J.B.Harborn, London. 617-652.
- Moghimpour E., Handali S. (2015).** Saponin : properties, methods of evaluation and applications. *Science domain international.* 5(3) : 207-220.
- Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles

Références bibliographiques

essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister Tlemcen, p: 49-50.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical DiPhenylPicrylHydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. Journal of Science and Technology. 26(2). 211 P.

Morton J. (1987). Pomegranate. In: Fruits of warm climates. Miami, Florida. p. 352–355.

N

Nathalie.C .(2014). Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique.Université de Reims Champagne-Ardenne,p 11-16.

O

Okuda T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. Phytochemistry. 66. p 2012 .

Ouerdane S et Ramdani F. (2007). Etude du pouvoir antioxydant de deux agrumes : Le citron et le pamplemousse. Mémoire d'Ingénieur d'Etat. Option contrôle de qualité et analyse. Université Abderrahmane Mira-Bejaia-Algérie. p 34 .

Oukabli, A. (2004). Le grenadier: Des variétés performantes pour la culture. Dans : Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA. Transfert de Technologie en Agriculture. Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et des Pêches maritimes, n0123.

Oullai L., Chamek C., 2018. Contribution à l'étude ethnopharmacognosique des plantes médicinales utilisées pour le traitement des affections de l'appareil digestif en Kabylie . mémoire de Master 2 : Science Pharmaceutique. Université Mouloud Mammeri , 127p

P

Pandian B.R., Afridah A.R., Qureshi A.K., Awang K. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using tannins. 32(3) : 408-413.

Paulette C., Jacque C., Dominique D., Georges D., Colette D., Jean D., Eviline F., Claudine F., Jean M.F., Moreno G., Colette G., Bernard J.J., Lamotte B.M., Nguyen D. (1998). Résistance bactérienne aux B-lactamine.médecine/science n°5. vol 14. 544 p.

Perronne C. (1999). Maladies infectieuses, volume 1. pp65.

Pibiri M.C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de

Références bibliographiques

ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Docteur. Lausanne Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL).

Pistelli L et Giorgi I. (2012). Antimicrobial properties of flavonoids. Chapitre 2. Dietary phytochemicals and microbes. Springer Science, Business Media Dordrecht. p 33 .

Pizzorno J E., Murray M T., 2020. Textbook of Natural Medicine-E-Book. 5eme édition, Elsevier, 644p

Poblocka-Olech L., Glód D., Żebrowska M E., Sznitowska M., Krauze-Baranowska M. (2016). TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum*. Acta pharmaceutica.

Prescott L.M, Harley J.PnetKlein D.A. (1995).Microbiologie. De Boeck ed. p1014

R

Roede J.R et Jones D.P. (2010).Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. Environmental and molecular mutagenesis. 51. p 380 .

Rwangabo P.C. (1993). La médecine traditionnelle au Rwanda.

S

Sanchez-Monge, E., 1974. Fitogenética : mejora de plantas. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Ministerio de Agricultura. Madrid. P 456.

Sofowora A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed N2, KARTHALA, paris. 22p.

Souilah N., 2018. Etude de la composition chimique et des propriétés thérapeutiques traditionnelles et modernes des huiles essentielles et des composés phénoliques de quelques espèces du Nord-est algérien. Thèse De Doctorat :Chimie Organique. Université des Frères Mentouri Constantine 1, 180p.

Souris C., Delphine J. (2015). Les terpènes naturels: usage et synthèse en chimiothérapie anticancéreuse

Stover E. Et Mercure E. W. (2007). The Pomegranate : A New Look at the Fruit of Paradise HortScience, 42(5) : 1088-1092.

T

Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., 2008. Improving the health-

Références bibliographiques

promoting properties of fruit and vegetable products. Technology and Nutrition No. 157. CEBAS (CSIC). Spain

V

Valko.M. et al .(2004). Metals,toxicity ans oxydative stress, p 1161-1208.

Van Antwerpen, P., & Neve, J. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: ciblage du système myéloperoxydase/péroxyde d'hydrogène/chlorure. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutique.

Vermerris W., Nicholson R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry, Springer, Dordrecht

Vincken J.P., Heng L., De Groot A., Gruppen H. (2007). Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68 : 275–297.

W

Wald, E. (2009). Le grenadier (*Punica granatum* L.): plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse. doc. Fac. Phar., Univ. Henri Poincaré-Nancy, 147 p.

Wertz J.L. (2010). La lignine. Document ValBiom – Gembloux AgroBio Tech.

Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W., Chen. F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food cChem*,; 97 (4) : 705-711.

Y

Yang, J.H.H., Hsia, T.C., Kuo, H.M., Chao, P.D., Chou, C.C., Wei, Y.H., Chung, J.G., 2006. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 34, 296–304.

Yoshida H., Kajimoto G., Emura S. (1993). Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 989-995.

Z

Zeghad N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale. Université Mentouri- Constantine.

| Références bibliographiques

Zerargui.F .(2015). Activité antioxydante des extraits de racines *TamusCommuniste* caractérisation des substances bioactives. Université Ferhat Abbas Sétif 1,p 3-10.

Sites électroniques :

Site web 01 : <http://www.bio-provence.org/IMG/pdf/fiche-technique-grenade-finale-bd.pdf>

Site web 02 : <http://image.google.com>

Site web 03 : <http://www.hello-naturelovers.com/2020/06/grenadier-punica-granatum-informations-générales-description-botanique-systematique.html>

Site web 04 : https://www.memoireonline.com/07/08/1340/m_dosage-biochimique-composes-phenoliques-datte-miel-sud-algerie16.html

Site web 05 : <http://univ-ency-education.com/uploads/1/3/1/0/132001/pharm3an-pharmacognosie19-tanins.pdf>

Site web 06 : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/alcaloides/4-localisation/>

Annexes

Préparation de la gélose nutritive

- 01-Préparateur la Gélose Nutritive en dissolvant la poudre 28g dans de l'eau distillée 1L
- 02-met dans l'Autoclave à 121°C pendant 15minutes. Refroidir à 50 à 55°
- 03-Refroidir à 50 à 55°
- 04-Couler le milieu en boîte de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer
- 05-Les plats préparés peuvent être utilisés immédiatement ou conservés dans des sacs en plastique à 2-8 ° C jusqu'à une semaine.
- 06-Inoculation du limbe par épuisement pour obtenir des colonies isolées
- 07-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).

Préparation de la gélose de Muller Hinton Agar

La gélose Muller est préparée avec un poids de 19 grammes de poudre, après quoi nous suivons les étapes suivantes :

- 01-Au Becher dissoudre la poudre d'agar Mueller dans 500 ml d'eau distillée, chauffer sous agitation jusqu'à homogénéité.
- 02-Laisser bouillir deux minutes.
- 03-D'autre part, des récipients en verre bien fermés sont placés dans l'autoclave pendant 30minutes à 121 degrés Celsius à des fins de stérilisation.
- 04-Pour l'utiliser, il faut le laisser refroidir, puis le verser dans un récipient stérilisé et le laisser reposer (en milieu stérilisé).
- 05-Il est prêt à l'emploi immédiatement ou stocké à une température de 2-8°C jusqu'à une semaine.



Balance analytique (OHAUS)



Autoclave(Raypa) et pH mètre (Hanna instruments)



Bain Marie (nüve bath, MEMMERT)



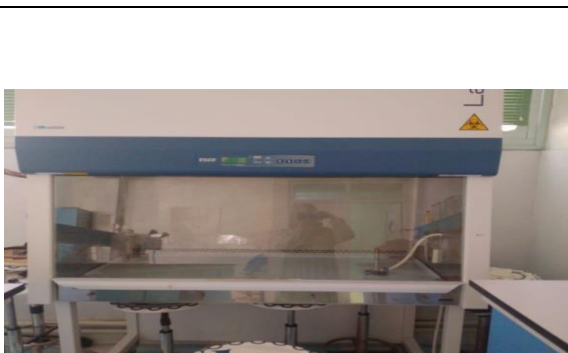
Vortex (VELP)



Evaporateur



Étuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT)



La haute



Bec benzène

Présenté par :Boudjil Billel	Encadré par Mr. MAAMAR Hichem
Thème : Exploration phytochimique et évaluation in vitro des activités biologiques d'une plante médicinale «<i>Punica granatum L.</i>»	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée	
<p><i>Punica granatum</i> est une plante appartenant à la famille des Punicaceae (Lythracées), elle est considérée comme l'une des plantes médicinales et comme un symbole de beauté .</p> <p>Cette étude vise à comparer deux extraits aqueux de <i>Punica granatum</i> préparés par infusion (EAI) et décoction (EAD), dont la composition chimique et les activités biologiques ont été testées.</p> <p>Les tests phytochimiques ont montré la présence des flavonoïdes, des tanins, des quinones libres, des terpénoïdes , des saponosides et des composés réducteurs et de dans les deux extraits. Nos résultats ont également montré des résultats négatifs à la fois pour les coumarines , les anthraquinones , les alcaloïdes , stéroïls et les triterpènes.</p> <p>La chromatographie sur couche mince (CCM) a montré que l'EAI est plus riche en flavonoïdes que l'EAD.</p> <p>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'EAI avec 1163.76±18µg/mg EAG pour les polyphénols et de 769.68±30µg EQ/mg pour les flavonoïdes.</p> <p>Les résultats de l'activité antioxydante effectuée en utilisant la méthode de réduction des radicaux DDPH, indiquent que l'EAI possède un grand potentiel antioxydant par rapport à l'EAD.</p> <p>Dans l'activité antibactérienne, <i>Punica granatum</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>	
Mots-clés: <i>Punica granatum</i> , activité antibactérienne, activité antioxydante, polyphénols, flavonoïdes.	
<p>Jury de soutenance : Présidente : Mme. KRIM Meriem (M.C.B) U Abbes Laghrour – Khenchela Promoteur : Mr. MAAMAR Hichem (M.C.B) U Abbes Laghrour – Khenchela Examinatrice : Mme. MALEL Hanan (M.C.B) U Abbes Laghrour – Khenchela</p>	

