



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun –Tiaret-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Nutrition et Technologie Agro-alimentaire

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Sciences alimentaire"

Spécialité: "Agroalimentaire et contrôle de qualité"

*Thème:*

**Etudes des activités biologiques des extraits  
phénoliques de *Punica granatum* L.**

Présenté et soutenu publiquement par:

- M<sup>elle</sup> Ardallah Louiza.
- M<sup>elle</sup> Fellan Hadjer.

Devant le Jury :

- |                 |                             |     |
|-----------------|-----------------------------|-----|
| • Président:    | M <sup>me</sup> BOUDALI S.  | MAA |
| • Promoteur:    | M <sup>me</sup> BENGUIAR R. | MAA |
| • Co-promoteur: | M <sup>me</sup> BENARABA R. | MCA |
| • Examineur:    | M. Hocine L.                | MCA |

Grade :

Année universitaire: 2019–2020

## *Remerciement*

*Avant tout, nous remercions Allah de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour achever ce modeste travail.*

*Nos vifs remerciements et profonde gratitude s'adressent à notre promoteur Mme Benquiar R. qui a accepté de nous encadrer, nous le remercions infiniment pour sa grande patience et ses conseils durant la réalisation du présent travail.*

*Ainsi nous tenons à remercions notre Co-promoteur Mme Benaraba R. d'avoir accepté de nous diriger ainsi pour ses précieux conseils, ses orientations, pour tous son aide.*

*On tiens à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont accordés en jugeant ce travail Mme Boudali S. qui nous a fait l'honneur par sa présence en qualité de président de jury et M Hocine L. pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous tenons à remercier vivement les membres de l'équipe de laboratoire en particulier Mme Abdellah Fatiha, à Melle Ayad Noura et à Melle Zahra pour leur aide et encouragement.*

*Un chaleureux remerciement à nos parents pour leur amour inestimables, leurs Confiances, leurs soutiens, leurs sacrifices et leurs encouragements, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

*Nous voudrions aussi remercier nos familles respectives, nos amies pour leurs encouragements et leurs soutiens moral.*

## Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mon cher papa **Djillali** qui nous a quittés très tôt et qui est toujours présent dans nos cœurs. J'espère que, le monde qui est le sien maintenant, il apprécie cet humble geste, preuve de reconnaissance de sa petite fille qui a toujours prié pour lui. Que Dieu, tout puissant, te garde dans son vaste paradis.

À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma chère mère **Dehiba** qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité, je vous dis merci maman que Dieu te protège.

À mes chers frères **Abdelrezak** qui joue le rôle d'un frère et d'un père en même temps et **Mohamed Amine** qui me soutient toujours.

À mes adorables sœurs **Kheira** et **Imene**, je vous dis merci pour vos encouragements, ainsi à mes nièces **Razan** et **Rital**.

À ma chère amie et binôme **Fellan Hadjer**, Un profond respect et remerciement pour ses qualités humaines et sociales et pour les efforts qu'elle a fournis pour réaliser ce travail.

À mes copines **Uhem**, **Zohra**, **Neram** et **Nesrine**.

À tous ceux qui me sont chère et que je n'ai pas pu citer.

À l'ensemble de tous les étudiants et étudiantes de ma promotion.



*Louiza*

## *Dédicace*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et de ferai toujours mon mieux pour rester ta fierté : mon père **Kouider**.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur : maman **Daoudia** que j'adore. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de mon vifre reconnaissance et mon profond estime.*

*Puisse le tout puissant vous donner la santé, bonheur et longue vie et vous protège de tout mal.*

*A mon âme sœur **Wassila**, je vous dis merci pour vos encouragements, ainsi à mon adorable nièce **Mira** et mes neveux **Rashed** et **Youssef**.*

*A mes chers frères **Mohamed**, **Youssef** et **Smaïl** pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral.*

*A ma chère sœur et binôme **Ardallah Louiza** un profond respect et remerciement pour son soutien et pour les efforts qu'elle a fournis pour réaliser ce travail.*

*À mes copines **Samia**, **Fatiha** et **Nesrine** que j'aime.*

*A tous ceux qui me sont chère et que je n'ai pas pu citer.*

*A l'ensemble de tous les étudiants et étudiantes de ma promotion.*



*Hadjer*

# TABLE DES MATIERES

---

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction

## Partie expérimentale

### Chapitre I. Matériel et Méthodes

I.1. Objectif .....	2
I.2.Lieu et durée du travail .....	2
I.3.Matériel et produits chimiques .....	3
I.4.Matériel végétale .....	4
I.5.Souches bactériennes utilisées .....	4
I.6.Procédure expérimentale.....	4
I.6.1. Extraction des composés phénoliques.....	6
I.6.1.Préparation de matériel végétal .....	6
I.6.2.Préparation des extraits à partir de l'écorce et la peau de grenade .....	6
I.6.3.Rendement d'extraction .....	6
I.7.Analyses phytochimiques d'écorce et de peau de grenade .....	6
I.7.1.Dosage des composés phénoliques.....	6
I.7.2.Dosage des flavonoïdes.....	8
I.8.Evaluation de l'activité antioxydante .....	9
I.8.1.Réduction de Fer: FRAP ( <i>Ferric reducing antioxydant power</i> ) .....	9
I.9.Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits .....	9
I.9.1.Préparation des pré-cultures .....	9
I.9.2.Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	9
I.9.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) .....	10

### Chapitre II. Résultats et Discussion

II.1.Extraction et quantification des composés phénoliques.....	12
II.1.1.Rendements d'extraction .....	12
II.2.Analyses phytochimiques .....	13
II.2.1.Teneurs en substances phénoliques des extraits d'écorce et de peau de grenade ....	13

<b>II.3.</b> Activité antioxydante des extraits phénoliques d'écorce et peau de grenade.....	16
<b>II.4.</b> Activité antibactérienne des extraits phénoliques d'écorce et de peau de grenade ...	18
<b>II.4.1.</b> Mise en évidence de l'activité antibactérienne par diffusion sur gélose .....	18
<b>II.4.2.</b> Détermination des concentrations minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) par la méthode de microdilution .....	19
<b>Conclusion et Perspectives</b> .....	23
<b>Références Bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

## *L I S T E   D E S   A B R E V I A T I O N S*

---

<b>AlCl<sub>3</sub> :</b>	Trichlorure d'Aluminium
<b>ATCC:</b>	American Type Culture Collection
<b><i>B.cereus</i> :</b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b>BMH :</b>	Bouillon de Muller de Hinton
<b>BN :</b>	Bouillon Nutritif
<b><i>B.subtilis</i> :</b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>CMB:</b>	Concentration Minimale Bactéricide
<b>CMI :</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>DMSO:</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>EAG:</b>	Equivalent Acide Gallique
<b><i>E. coli</i> :</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EEEG :</b>	Extrait éthanolique de l'Ecorce de Grenade
<b>EEPG :</b>	Extrait éthanolique de la peau de Grenade
<b>EMEG:</b>	Extrait méthanolique de l'Ecorce de Grenade
<b>EMPG :</b>	Extrait méthanolique de la peau de Grenade
<b>EQ :</b>	Equivalent Quercétine
<b>(FeCl<sub>3</sub>)<sub>2</sub> :</b>	Chlorure de fer III
<b>FeSO<sub>4</sub> :</b>	sulfate de fer
<b>FRAP:</b>	<i>Ferric Reducing Antioxydant Power</i>
<b>GMH :</b>	Gélose de Muller Hinton
<b>GN :</b>	Gélose Nutritive
<b>K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> :</b>	Ferricyanure de potassium
<b>(K<sub>h</sub><sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> :</b>	Phosphate de potassium monobasique
<b>Ms :</b>	Matière sèche
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> :</b>	Carbonate de sodium
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> :</b>	Hydrogénophosphate de sodium
<b><i>P. aeruginosa</i> :</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>P/V:</b>	Poids / volume

## *LISTE DES FIGURES*

---

<b>Figure 1:</b> (A) peau et (B) écorce de fruit de grenade ( <i>Punica-granatum</i> L.).....	4
<b>Figure 2:</b> Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale.....	5
<b>Figure 3 :</b> Rendements d'extraction méthanolique des composés phénoliques de l'écorce et de la peau de grenade ( <i>Punica granatum</i> L.).....	12
<b>Figure 4 :</b> Rendements d'extraction éthanolique des composés phénoliques de l'écorce et de la peau de grenade ( <i>Punica granatum</i> L.).....	12
<b>Figure 5 :</b> Teneur en composés phénoliques totaux d'extrait méthanolique de l'écorce et de la peau de grenade ( <i>Punica granatum</i> L.).....	14
<b>Figure 6 :</b> Teneur en composés phénoliques totaux d'extrait éthanolique de l'écorce et de la peau de grenade ( <i>Punica granatum</i> L.).....	14
<b>Figure 7 :</b> Teneur en Flavonoïdes d'extrait méthanolique de l'écorce et de la peau de grenade ( <i>Punica granatum</i> L.).....	14
<b>Figure 8:</b> Teneur en Flavonoïdes d'extraits éthanolique de l'écorce et de la peau de grenade ( <i>Punica granatum</i> L.).....	14
<b>Figure 9 :</b> Effet réducteur des extraits méthanolique et éthanolique de la peau de grenade Evalué par la méthode de FRAP.....	17
<b>Figure 10:</b> Effet réducteur des extraits méthanolique et éthanolique de l'écorce de grenade évalué par la méthode de FRAP.....	17



## ***LISTE DES TABLEAUX***

---

<b>Tableau 1 :</b> Matériel et produit chimique utilisés. ....	3
<b>Tableau 2:</b> Diamètres des zones d'inhibition (mm) entourant des extraits méthanolique et éthanolique de grenade (écorce et peau) en présence des souches pathogènes étudiées. ..	19
<b>Tableau 3 :</b> Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) des extraits phénoliques d'écorce et peau de grenade (mg /ml) vis à vis des souches bactériennes testées .....	20

## ***L I S T E   D E S   A N N E X E S***

---

**Annexe I:** Composition des milieux de cultures utilisés

**Annexe II:** Différentes parties de *Punica granatum* L.

**Annexe III :** Extraits secs de l'écorce et de la peau de grenade obtenus.

**Annexe IV:** Courbes d'étalonnage pour les composés phénoliques et flavonoïdes d'écorce et de peau de grenade

**Annexe V:** Courbe d'étalonnage pour l'activité antioxydante des extraits phénoliques d'écorce et de peau de grenade

**Annexe VI:** Effets des extraits éthanoliques et méthanoliques de l'écorce et de la peau de grenade vis-à-vis des souches testées

**Annexe VII :** Activité antibactérienne des extraits éthanoliques et méthanoliques d'écorce et de peau de grenades vis-à-vis des souches pathogènes

# Introduction

## Introduction

---

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques, mènent les chercheurs à puiser dans le monde végétal, particulièrement les plantes médicinales en quête d'une solution alternative (**Gaur, 2017**). De nombreuses études ont rapporté les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des plantes médicinales et leurs composants (**Kusuma et al., 2014; Al-saeed et al., 2015; Ouelbani et al., 2016**). De ce fait, la découverte de nouvelle molécule d'origine végétale et la mise au point de nouveaux médicaments sont devenues une impérieuse nécessité. Les propriétés thérapeutiques des matrices naturelles sont dues à la présence des métabolites secondaires. Ces biomolécules, à vertu thérapeutique complémentaire ou synergiques font l'objet aujourd'hui d'un regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique, ceci est dû à leur puissante activité antioxydante et antibactérienne offrant ainsi des stratégies prometteuses dans la prévention de multiples pathologies qui posent des problèmes majeurs en santé publique.

Le fruit du grenadier (*Punica granatum* L.) est l'un des plus anciens fruits comestibles connus, il est cultivé principalement dans la région méditerranéenne, et est utilisé depuis des siècles pour traiter de nombreuses maladies tels que les infections parasitaires et microbiennes, ulcères, diarrhée, hémorragie et dysenterie (**Kim et al., 2002; Reddy et al., 2004; Johanningsmeier et Harris., 2011**). Il est l'un des fruits les plus riches en composés phénoliques comme les tannins et les anthocyanines (**Gil et al., 2000; Zaouay et al., 2012**). La grenade peut être consommée fraîche ou transformée en jus de fruits, gelée et confiture; cependant la consommation de ce fruit génère des quantités considérables de sous-produits; en effet, les écorces de grenade sont souvent rejetés sans valorisation. Ces derniers présentent diverses activités biologiques telles que la neutralisation des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne et la diminution des risques de maladies cardiovasculaires, cérébro-vasculaires et certains cancers (**Mena et al., 2011; Zhu et Liu, 2013**). Les écorces de grenade peuvent être considérées comme une solution prometteuse pour la production des extraits riches en antioxydants naturels qui sont devenus très utilisés pour les applications médicales et alimentaires, de ce fait, diverses études sont intéressées de trouver des méthodes de valorisation de ces écorces et à déterminer leurs vertus thérapeutiques. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'évaluer les propriétés antioxydante et antibactérienne des extraits issus de deux parties de grenade telles que l'écorce et la peau.

# Partie Expérimentale

# Chapitre I

## Matériel et Méthodes

**I.1.Objectif**

Cette présente étude s'intéresse à étudier l'effet d'extraction par les solvants (Ethanol ou Méthanol) sur la teneur en composés phénoliques de deux parties de grenade (*Punica-granatum L.*) (Écorce et peau), ainsi d'évaluer leur influence sur les propriétés antioxydante et antibactérienne.

**I.2.Lieu et durée du travail**

La démarche expérimentale concernant cette étude a été mise en œuvre sur une période à partir du 17 Décembre au 12 Mars 2020, elle a eu lieu au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire d'Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales *Université Ibn Khaldoun Tiaret.*
- Laboratoire de Microbiologie, de physiologie végétale, et de technologie alimentaire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie *Université Ibn Khaldoun –Tiaret.*

## I.3. Matériel et produits chimiques

Les différents appareils et les produits chimiques utilisés au cours de la réalisation de ce travail sont répertoriés dans le tableau suivant :

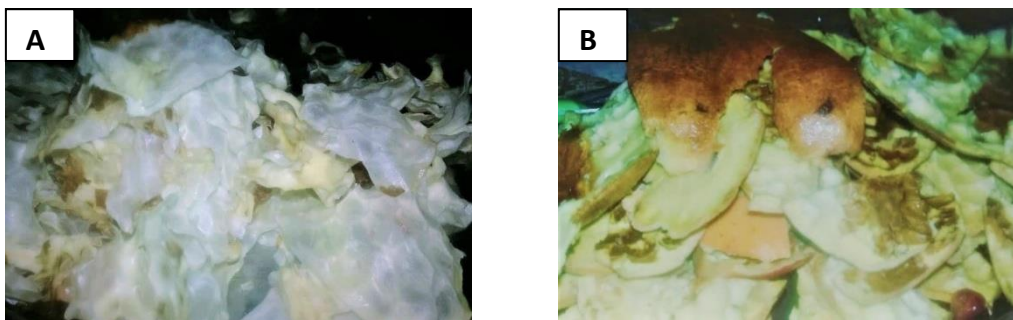
**Tableau 1 :** Matériel et produits chimiques utilisés.

Matériel et appareillage	Solvants et réactifs	Milieux de culture
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Autoclave ;</li> <li>-Agitateur magnétique thermique ;</li> <li>-Bain marie ;</li> <li>-Balance électrique ;</li> <li>-Microscope optique ;</li> <li>-Spectrophotomètre ;</li> <li>-Etuve ;</li> <li>-Broyeur ;</li> <li>-Micropipettes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ethanol pur (96%) ;</li> <li>-Méthanol pur (99.9%) ;</li> <li>-Carbonate de sodium (<math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math>)</li> <li>-Diméthyle sulfoxyde (DMSO pur à 99.5%) ;</li> <li>-Réactif de Folin Ciocalteu ;</li> <li>- Acide gallique ;</li> <li>-Acide ascorbique ;</li> <li>-Quercétine ;</li> <li>- Chlorure de fer III (<math>\text{FeCl}_3</math>),</li> <li>-Sulfate de fer (<math>\text{FeSO}_4</math>)</li> <li>-Phosphate de potassium-monobasique (<math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>) ;</li> <li>-Hydrogénophosphate de sodium(<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>) ;</li> <li>-Trichlorure d'aluminium (<math>\text{AlCl}_3</math>) ;</li> <li>- Acide trichloroacétique;</li> <li>-Eau physiologique (0.9%) ;</li> <li>-Fuchsine ;</li> <li>-Violet de Gentiane;</li> <li>-Alcool ;</li> <li>-Lugol ;</li> <li>-Disques d'antibiotiques Ticarcillin (<math>\text{C}^{75}</math>),</li> <li>Tétracycline (<math>\text{C}^{30}</math>) ;</li> <li>-2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bouillon et Gélose nutritif ;</li> <li>- Gélose de Héктоen ;</li> <li>- Milieu de Muller Hinton.</li> </ul>



#### I.4. Matériel végétale

Il est constitué d'écorce et de peau du fruit de grenade (*Punica-granatum L.*), un fruit occupant une place d'excellence dans l'arsenal des plantes médicinales pour sa richesse en composants bioactifs. Pour la réalisation de cette étude, le fruit a été procuré par voie commerciale en Décembre 2019.



**Figure1** : (A) peau et (B) écorce de fruit de grenade (*Punica-granatum L.*)

#### I.5. Souches bactériennes utilisées

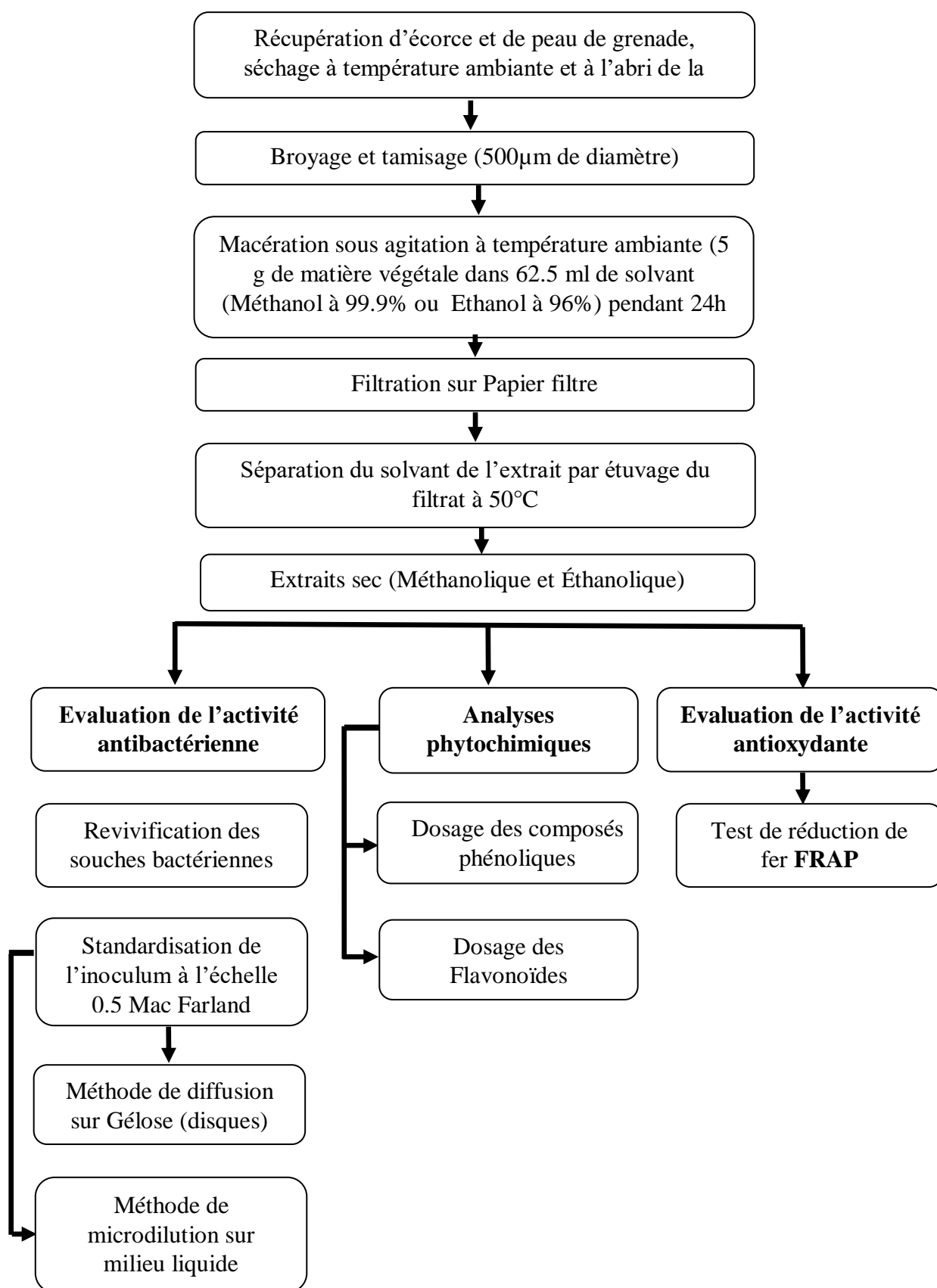
Les souches utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne sont des souches pathogènes de Collection Internationale ATCC (American Type Culture Collection). Il s'agit d'*Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 10536, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ATCC 10876, et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853. Ces souches ont été fournies gracieusement par l'unité de microbiologie du groupe SAIDAL de Média et l'Hôpital Mostapha Bacha, Alger.

#### I.6. Procédure expérimentale

Notre présent travail s'articule autour de deux composantes principales:

- Extraction et quantification des composés phénoliques de la peau et de l'écorce de grenade ;
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des composés phénoliques des extraits méthanolique et éthanolique de l'écorce et de la peau de grenade.

L'approche expérimentale globale de cette étude a été illustrée dans l'organigramme Suivant:



**Figure 2:** Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale

## I.6.Extraction des composés phénoliques

### I.6.1.Préparation de matériel végétal

L'écorce et la peau de fruit de grenade ont été soigneusement nettoyées et découpées en petits morceaux et séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ces morceaux ont été ensuite broyés à l'aide d'un broyeur mécanique (Pulverisette, Fritsch, Allemagne) et tamisés dans un tamis ayant un diamètre de 500 µm.

### I.6.2.Préparation des extraits à partir de l'écorce et la peau de grenade

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée par le biais de la technique de macération (**Hadrich et al., 2014**). Une masse de 5 g de matière végétale sèche sous forme de poudre a été macérée dans 62,5ml de méthanol ou éthanol pure. Après une agitation de 24h à température ambiante et à l'obscurité, une filtration a été faite sur papier filtre. Le filtrat obtenu a été débarrassé de son solvant par évaporation à 50°C, pour obtenir des extraits secs. Ce dernier a été conservé à -20°C pour les éventuelles expérimentations.

### I.6.3.Rendement d'extraction

Le poids en extraits sec a été calculé par la différence entre le poids du ballon plein (après élimination du solvant) et le poids du ballon vide. Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage. Il est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (PF/PI) \times 100$$

Où :

**R** : le rendement en pourcentage.

**PF** : le poids de l'extrait sec en g.

**PI** : le poids de la poudre mise à l'extraction en g.

## I.7.Analyses phytochimiques de l'écorce et de peau de grenade

### I.7.1.Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits de l'écorce et de la peau de grenade a été effectué par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par **Singleton et al, (1999)**.

### ▪ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ).

Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques dans un milieu alcalin par ce réactif, ou il y aura la formation d'un nouveau complexe d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, présentant un maximum d'absorption dont la longueur d'onde  $\lambda=760$  nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux. Le dosage des composés phénoliques a été effectué par la comparaison de la densité optique observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

### ▪ Technique

250 $\mu$ L de chaque extrait ont été ajoutés à 250 $\mu$ L de réactif de Folin Ciocalteu ayant une concentration de 0.2N, après une incubation de 2min, 500 $\mu$ L de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) (7.5 % (p/v)) ont été additionnés. Le mélange ainsi obtenu a été incubé de nouveau pendant 30min à une température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre (Shimadzu Corporation, Japan) à 760nm contre un blanc sans extrait.

Notons qu'une courbe d'étalonnage a été parallèlement réalisée (**annexe 4**) afin de quantifier le taux de polyphénols totaux dans nos extraits, cette courbe a été établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 ; 0.031 ; 0.0156 ; 0.0078mg/ml) utilisé comme standard de référence, ce dernier a subi les mêmes conditions expérimentales que l'échantillon. La teneur en composés phénoliques est exprimée en Equivalent Acide Gallique (mg Equivalent d'Acide Gallique (EAG) par g de matière sèche.

Le calcul de cette teneur a été effectué selon la formule suivante:

$$C = (c \times V \times D / m)$$

Où :

**C**: Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g MS).

**c**: Concentration de l'échantillon calculée.

**D**: Facteur de dilution.

**V**: Volume de solvant en ml utilisé pour l'extraction.

**m**: Masse de l'échantillon en g.

### I.7.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$  avec lequel ils forment des complexes aluminium-flavonoïdes. La méthode adoptée pour le dosage des flavonoïdes est celle décrite par **Bahorun et al. (1996)** dans les différents d'extraits d'écorce et de peau de grenade.

#### ▪ Principe

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

#### ▪ Technique

1mL de la solution d'extrait a été ajouté à 1mL d' $AlCl_3$  à 2% (p/v) (préparé dans le méthanol ou éthanol pur), puis le mélange a été incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 10min. Ensuite, l'absorbance a été mesurée immédiatement à une longueur d'onde de 430nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (Shimadzu Corporation, Japan).

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine (annexe n°4). La teneur en flavonoïdes a été exprimée en microgramme équivalent de Quercétine par gramme de matière sèche ( $\mu g$  EQ/g MS).

Le calcul de cette teneur a été effectué selon la formule suivante :

$$C = (c \times V \times D / m)$$

Où :

**C**: Teneur en flavonoïdes exprimée en mg Equivalent quercétine par g de matière sèche.

**c**: concentration de l'échantillon calculé.

**D**: facteur de dilution.

**V**: volume utilisé pour l'extraction en ml.

**m**: Masse de l'échantillon en g.

## I.8. Evaluation de l'activité antioxydante

### I.8.1. Réduction de Fer: FRAP (Ferric reducing antioxydant power)

#### ▪ Principe

Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en ferrocyanure de potassium ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Oyaizu, 1986).

Le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans l'extrait est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu, (1986). Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations a été mélangé avec 2.5mL d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH=6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1% (p/v). L'ensemble a été incubé au bain-marie à 50°C pendant 20min ensuite, 2.5mL d'acide trichloroacétique à 10% (p/v) ont été ajoutés pour stopper la réaction. Après incubation un aliquote 2.5mL a été combiné avec 2.5mL d'eau distillée et 0.5mL d'une solution aqueuse de chlorure de fer III  $\text{FeCl}_3$  à 0.1% (p/v). La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé.

Le potentiel réducteur des extraits et des standards sont exprimés par les valeurs de concentrations effectives à (50%) ( $\text{CE}_{50}$ ). Les valeurs de  $\text{CE}_{50}$  correspondant à la concentration avec une absorbance de 0.5 (Fernandes et al., 2017)

## I.9. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits

### I.9.1. Préparation des pré-cultures

A partir de la gélose nutritive, milieu de conservation, un prélèvement de chaque souche (*E. coli* ATCC 10536, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 10876, et *P. aeruginosa*) a été effectué à l'aide d'une pipette pasteur, puis mis dans 10mL de bouillon nutritif et incubé à 37°C pendant 24h. Après ce temps d'incubation, les souches ont subi un repiquage en milieu solide correspondant à chaque souche, ces ensemencements ont été suivis d'une incubation de 18h à 37°C et cet afin d'obtenir des cultures jeunes.

### I.9.2. Méthode de diffusion en milieu gélosé

L'activité antibactérienne des différents extraits végétaux a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé telle que décrite par Bauer et al., (1966) et reprise par Barry et al., (1985).

Cette méthode mesure une diffusion radiale de l'extrait à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. A partir d'une culture jeune de 18h d'incubation, une suspension bactérienne a été préparée dans l'eau physiologique stérile

(0.9%) pour chaque souche. La turbidité de cette suspension a été ajustée à 0.5 Mac Farland. Cet inoculum a été ensemencé par écouvillon à la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton. Les boîtes de Pétri ainsi ensemencées ont été laissées sécher à l'air libre pendant 30min. Ensuite, des disques de Whatman de 6mm de diamètre imprégnés 20 µL de chaque extrait, ont été ensuite déposés à la surface de la gélose ensemencée. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24h (Adesokan et al., 2007).

Les screening antibactérien ont été effectués avec des concentrations de 250 à 62.5mg/ml. Des boîtes dites témoins positifs dans les quelles sont mis des disques d'antibiotique (Tétracycline(C<sup>30</sup>), Ticarcillin(C<sup>75</sup>)) et d'autres dites témoins négatifs «avec des disques imbibés de DMSO pur» ont été réalisées.

L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (Doughari et al., 2007).

### I.9.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en extrait. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne comme recommandé par le Comité National des Normes des Laboratoires Cliniques (1997).

#### ▪ Technique

250 mg /mL de chaque extrait (méthanolique ou éthanolique de l'écorce ou la peau de grenade) ont été préparés et dilués dans un bouillon Mueller Hinton à des concentrations décroissantes (125 ; 62.5 ; 31.25; 15.62 ; 7.81; 3.90; 1.95 ; 0.97 ; 0.48; 0.24) mg /mL. Ensuite 95µL de chaque concentration générée, ont été déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits (Klančnik et al., 2010), les puits ainsi préparés ont été inoculés par 5µL de l'inoculum (10<sup>6</sup> UFC/ml) de chaque suspension bactérienne à étudier (*E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* et *P.aeruginosa*). Sur la même microplaque des puits ont été ajoutés seulement de bouillon Muller Hinton afin de servir de témoin négatif, alors que des autres puits de la même microplaque ont reçu le milieu Mueller Hinton inoculé par la même concentration des bactéries citées précédemment et sans extrait (témoin positif).

Les microplaques ainsi préparées ont été incubées 18h à 37°C. A la fin de cette incubation la croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant 20µL d'un révélateur de croissance le 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) (Sigma-Aldrich). La CMI a été déduite à partir du premier puits de concentration dépourvue de croissance bactérienne.

Pour la détermination des CMB, des prélèvements ont été pris à partir des puits qui ne montre aucune croissance bactérienne ont étéensemencés sur la gélose de Muller Hinton puis les boites ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24h.



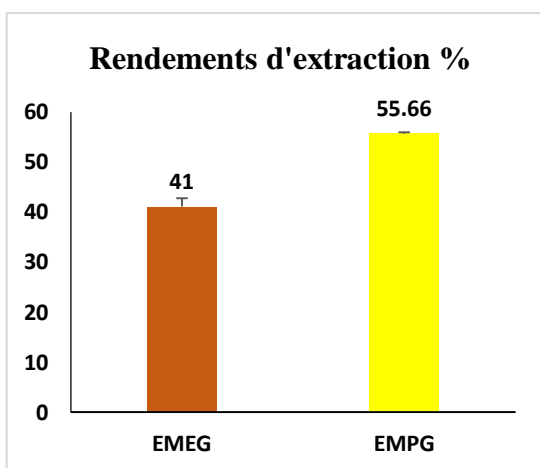
# Chapitre II

## Résultats et Discussions

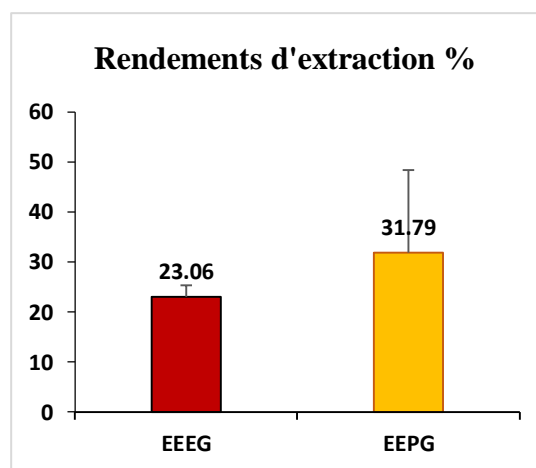
## II.1.Extraction et quantification des composés phénoliques

### II.1.1.Rendements d'extraction

Les rendements obtenus après extraction des composés phénoliques de deux parties de grenade en utilisant le méthanol ou l'éthanol pur sont représentés dans la figure 3 et 4. Les résultats dévoilent que l'extrait méthanolique issu d'écorce et de la peau de grenade présente un rendement élevé estimé à 41% et 55.66%, respectivement par rapport aux extraits éthanoliques avec un taux de 23.06% pour l'écorce et 31.79% pour la peau de grenade.



**Figure 3:** Rendements d'extraction méthanoliques des composés phénoliques de l'écorce et de la peau de grenade (*Punica granatum* L.)



**Figure 4 :** Rendements d'extraction éthanolique des composés phénoliques de l'écorce et de la peau de grenade (*Punica granatum* L.)

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne  $\pm$  Écart-type des trois essais indépendants).

EEEG: extrait éthanolique d'écorce de grenade; EPPG: extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EMEG; extrait méthanolique d'écorce de grenade; EMPG: extrait méthanolique de peau de grenade.

Ces résultats concordent de ceux obtenus par **Shiban et al., (2012)**, ces derniers montrent un rendement d'extraction de l'ordre de 45%. D'autre étude indique que l'extraction méthanolique représente un meilleur rendement entre 31.5 à 48.2% (**Li et al., 2006; Zaki et al., 2015**). Les variations observées entre les rendements dépendent du type de solvant, en effet celui-ci affecte l'extraction, il est bien évident qu'il existe une affinité entre le solvant d'extraction et les composés extraits, ainsi que son activité biologique (**Lee et al., 2003; Ghasemzadeh et al., 2011**). Aussi, il est largement admis que les variations des rendements d'extraction pourrait être attribués non seulement à la différence de la polarité au solvant utilisé, qui joue un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques, mais aussi à la polarité des composés phénoliques qui constituent l'extrait (**Felhi et al., 2017**). Par conséquent, ce résultat a confirmé l'effet du solvant sur le rendement d'extraction ceci affirme que l'écorce et la peau de grenade sont riche en substances polaires, et que le méthanol est le

meilleur solvant et le plus utilisé pour obtenir un rendement élevé en polyphénols (**Escribano-Bailôn et Santos-Buelga, 2003**). L'amélioration du rendement d'extraction des composés phénoliques par l'utilisation du méthanol peut s'expliquer par le simple fait que cet alcool est plus polaire que l'éthanol. C'est pourquoi, il est connu par la plus grande efficacité pour extraire des quantités maximales de composants d'intérêt (**Bourgou et al., 2016**). Le méthanol est capable d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires et de faciliter l'extraction d'un grand nombre de composés polaires ainsi que des composés de moyenne et de faible polarité (**Seidel, 2005**).

## II.2. Analyses phytochimiques

### II.2.1. Teneurs en substances phénoliques des extraits d'écorce et de peau de grenade

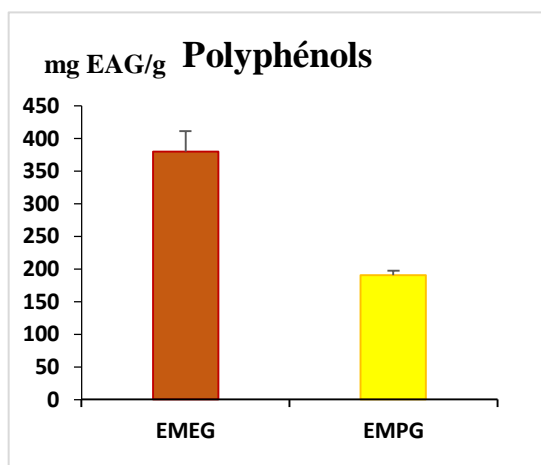
La teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes des extraits obtenus à partir des écorces et de peau de fruit de *Punica granatum* L., sont indiqués dans les figures 5, 6, 7 et 8).

L'analyse quantitative des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes des différents extraits, méthanoliques et éthanoliques, sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par g de la matière sèche et en mg équivalent de Quercitine par g de la matière sèche (EQ) (**Annexe IV**).

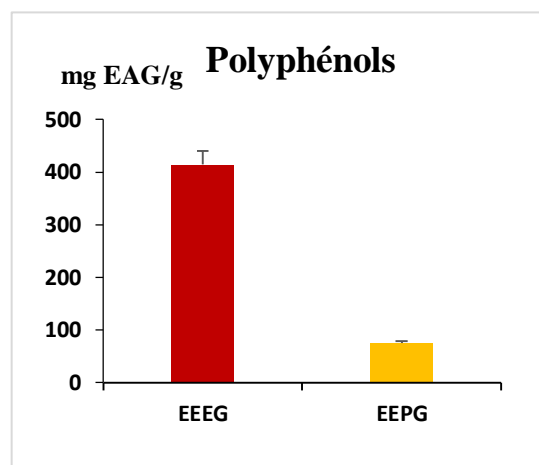
De ces résultats, nous constatons que l'extraction par la technique de macération en utilisant le méthanol ou éthanol, aboutit à des teneurs en composés phénoliques différentes. Ces teneurs varient considérablement entre les deux parties de grenade (écorce et peau).

Les composés phénoliques sont de l'ordre de  $379.65 \pm 28.41$  mg EAG/g MS pour l'extrait méthanolique de l'écorce et  $190.75 \pm 6.54$  mg EAG/g MS pour l'extrait méthanolique de la peau de grenade. De même, l'extrait éthanolique de l'écorce de grenade a également montré un contenu élevé, dont lequel il est estimé à  $414.41 \pm 26.14$  mg EAG/g MS alors que l'extrait éthanolique de la peau de grenade est estimé à  $74.85 \pm 4.66$  mg EAG/g MS.

Similairement, pour les flavonoïdes il y a une différence entre la peau et l'écorce de fruits de grenade, l'extrait méthanolique de l'écorce et de la peau de grenade indiquent des teneurs éloignées enregistrées à  $50.88 \pm 6.43$  mg EQ/g MS et  $3.50 \pm 0.27$  mg EQ /g MS, respectivement et va de même pour l'extrait éthanolique issu d'écorce et de peau de fruit de grenade où enregistrées respectivement  $12.16 \pm 0.23$  mg EQ/g MS  $4.89 \pm 0.37$  mg EQ/g MS (figure 7 et 8).

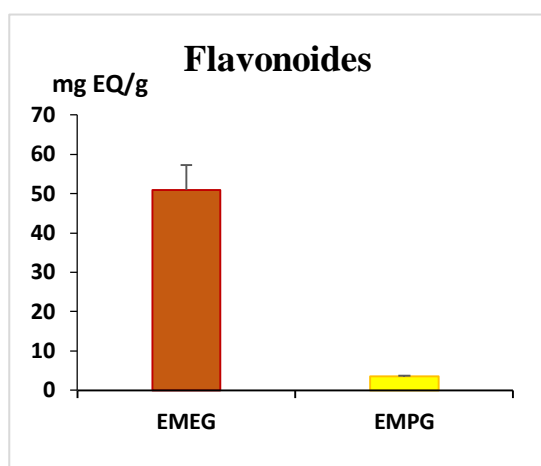


**Figure 5:** Teneur en composés phénoliques totaux d'extrait méthanolique de l'écorce et de la peau de grenade (*Punica granatum* L.)

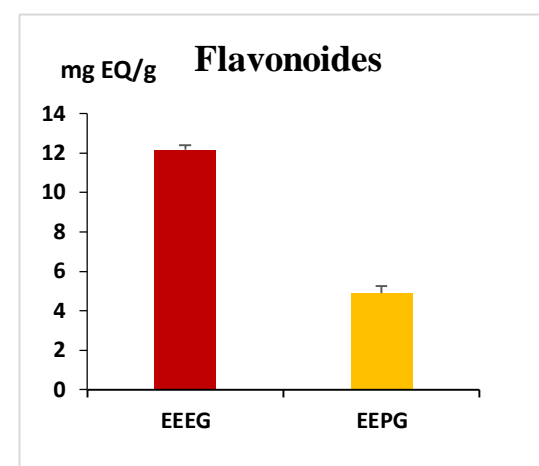


**Figure 6:** Teneur en composés phénoliques totaux d'extrait éthanolique de l'écorce et de la peau de grenade (*Punica granatum* L.)

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne  $\pm$  Écart-type des trois essais indépendants).  
 EEEG-: extrait éthanolique d'écorce de grenade; EEPG: extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EMEG; extrait méthanolique d'écorce de grenade; EMPG: extrait méthanolique de peau de grenade.



**Figure 7:** Teneur en Flavonoïdes d'extrait méthanolique de l'écorce et de la peau de grenade (*Punica granatum* L.)



**Figure 8:** Teneur en Flavonoïdes d'extrait éthanolique de l'écorce et de la peau de grenade (*Punica granatum* L.)

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne  $\pm$  Écart-type des trois essais indépendants).  
 EEEG-: extrait éthanolique d'écorce de grenade; EEPG: extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EMEG; extrait méthanolique d'écorce de grenade; EMPG: extrait méthanolique de peau de grenade.

D'après nos résultats il en ressort que les écorces sont plus riches en polyphénols et flavonoïdes que les peaux de fruit de grenade, ces résultats corroborent ceux indiqués par **Fernandes et al., (2015)**, ils ont montré que les teneurs en composés phénoliques issus d'écorce sont très élevés en comparaison avec la peau, la graine et le jus de grenade. Une autre étude réalisée sur l'écorce et les graines de grenade, les teneurs en composés phénoliques issus de l'extrait méthanolique issu d'écorce sont supérieures par rapport à l'extrait méthanolique issu de graine de fruit de grenade (**Jalal et al., 2018**).

**Danial et Basudan, (2019)**, dévoilent que la concentration en composés phénoliques dans l'extrait éthanolique d'écorce et de peau de grenade issus par macération sont de l'ordre de 23 et 22mg /g de matière sèche respectivement. Ces valeurs sont inférieures à valeurs obtenues au cours de notre étude.

Aussi, la comparaison des extraits laisse apparaître une présence très abondante des polyphénols et flavonoïdes dans les extraits méthanoliques que dans les extraits éthanoliques. Ceci laisse suggérer que l'extraction par macération en utilisant le méthanol donne des teneurs plus élevées en composés phénoliques essentiellement flavonoïques en comparaison avec l'éthanol.

Ces résultats corroborent ceux indiqués par **Hadrih et al., (2014)**. Ces auteurs ont réalisé une extraction des composés phénoliques à partir d'écorce de grenade en utilisant la technique de macération. Différents solvants ont été utilisés au cours de cette étude, parmi ces solvants le méthanol, l'éthanol et l'eau, ces auteurs rapportent que la teneur en composés phénoliques totaux des extraits obtenus après 24 h de macération, varie entre 0 et  $290.1 \pm 0.57$  mg EAG/g de matière sèche. D'autre étude, confirme que les teneurs en composés phénoliques de l'extrait méthanolique issu de l'écorce sont de l'ordre de 274 mg EAG/g et de 56.4 mg RE/g de flavonoïdes (**Shiban et al., 2012**). De même **Kumar et al., (2013)** ont affirmé que la quantité en polyphénols de l'extrait méthanolique de l'écorce est de l'ordre de  $298 \pm 4.86$  mg EAG /g MS et les flavonoïdes de  $49.8 \pm 2.14$  mg EQ /g MS. En outre, **Hasnaoui et al., (2014)** ont enregistré  $256.11 \pm 0.73$  et  $251.61 \pm 42.69$  mg EAG /g de la quantité des composés phénoliques pour deux cultivars de la variété Gabsi. D'autres auteurs ont démontré, au cours de leurs travaux que la teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique de 07 cultivars de grenade (Ruby et Wonderful) est de l'ordre de 295.5 mg /g de matière sèche et de 97.8 mg/g de MS) de flavonoïdes (**Fawole et al., 2012**).

Cependant, une divergence dans les teneurs en composés phénoliques a été observée entre nos résultats et les résultats des autres études. En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques tels que des facteurs géographiques, climatiques et les facteurs génétiques, mais

également le degré de maturation du plant et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Fiorucci, 2006).

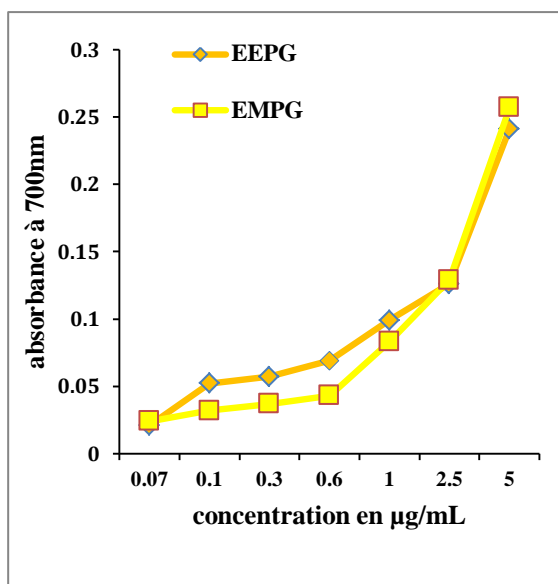
### II.3. Activité antioxydante des extraits phénoliques d'écorce et de peau de grenade

Les résultats concernant l'activité réductrice des extraits issus d'écorce et peau de grenade, acide gallique, acide ascorbique et la quercétine sont représentés dans la figure (9 et 10).

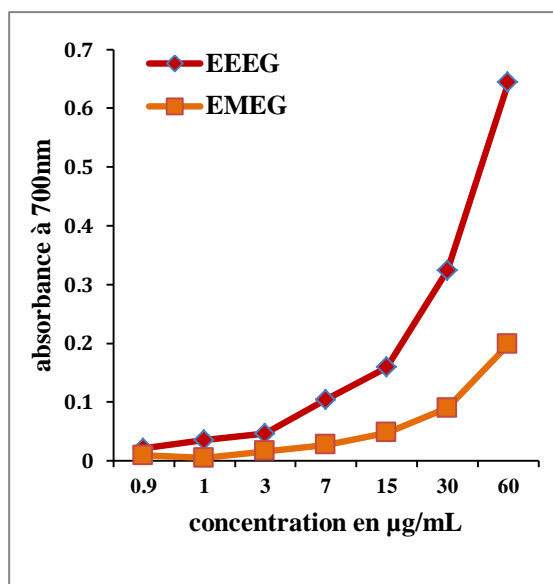
D'après les résultats obtenus, nous constatons que la capacité réductrice des extraits d'écorce et peau est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'extrait (dose dépendent). Ceci s'explique par la contribution des antioxydants donneurs des électrons, présents dans les extraits méthanolique et éthanolique ainsi à leur profil chimique riche en flavonoïdes, en protocyanidines et en polyphénols totaux (Singh et al., 2002). Ces résultats corroborent ceux indiqués par (Derakhshani et al., 2018) ont dévoilé que les écorces de grenade ont un pouvoir antioxydant puissant en comparaison à d'autres parties de grenade. La forte activité antioxydante de l'extrait d'écorce de grenade peut être due à sa teneur élevée en tannin, particulièrement la punicalagine (Li et al. 2006; Apak et al., 2007).

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait éthanolique de l'écorce et peau présente un pouvoir réducteur plus élevé en comparaison avec l'extrait méthanolique.

La variabilité du pouvoir antioxydant entre les extraits testés peut être liée à la nature physico-chimique des molécules présents dans les extraits et par la différence de sélectivité du solvant pour extraire certains groupes d'antioxydants (Djeridane et al., 2006). Selon Cowan, (1999), lors de l'extraction, les molécules bioactives sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité. Par conséquent, le changement de la nature du solvant modifie son efficacité pour extraire un groupe spécifique des antioxydants, ce qui influence les activités antioxydantes des extraits (Chernane et al., 2014).



**Figure 9:** Effet réducteur de l'extrait méthanolique et éthanolique de la peau de grenade évalué par la méthode FRAP.



**Figure 10:** Effet réducteur de l'extrait méthanolique et éthanolique de l'écorce de grenade évalué par la méthode FRAP

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne  $\pm$  Écart-type des trois essais indépendants).  
 EEEG: extrait éthanolique d'écorce de grenade; EEPG: extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EMEG; extrait méthanolique d'écorce de grenade; EMPG: extrait méthanolique de peau de grenade.

## II.4. Activité antibactérienne des extraits phénoliques d'écorce et peau de grenade

### II.4.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par diffusion sur gélose

Les résultats du test concernant la sensibilité antibactérienne aux extraits méthanolique et éthanolique d'écorce et peau de grenade sont indiqués dans le tableau 2.

Ces résultats dévoilent que les deux extraits exercent un effet inhibiteur sur la croissance de l'ensemble des souches *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *B. cereus*. Les diamètres des zones d'inhibition sont situés entre 7 et 20.5 mm pour l'extrait méthanolique et de 9 à 21.25 mm pour l'extrait éthanolique. Tandis que les extraits issus de peau de grenade ont une activité élevée contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif, ce qui est en accord avec les travaux de **Denial et Basudan, (2019)**.

En parallèle des disques d'antibiotique ont été utilisés pour étudier le comportement de ces souches bactériennes vis-à-vis de ces antibiotiques. Ces résultats révèlent que le Ticarcillin (C<sup>75</sup>) exerce un effet inhibiteur sur l'ensemble des souches *P. aeruginosa* et *B. cereus*. Les diamètres des zones d'inhibition sont situés entre 21 et 23 mm, aussi la Tétracycline (C<sup>30</sup>) inhibe toutes les cultures bactériennes testées, les diamètres obtenus sont compris entre 12 et 19 mm.

Au vu de l'ensemble de ces résultats nous constatons que les souches de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (Gram positif) sont les plus susceptibles aux extraits en comparaison avec les souches de *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif); ceci peut être expliqué par la différence de la structure de la paroi entre les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives (**Ali-Shtayeh et al., 1998**). Ces données confirment celles obtenues par **Malviya et al., (2014)**, ces auteurs rapportent que *S. aureus*, est sensible à l'extrait méthanolique et éthanolique de l'écorce de grenade avec des zones d'inhibition de 24±0.53 mm et 20±0.31 de diamètre respectivement, contrairement à *E. coli* qui s'est montrée résistante à ces mêmes composés (7 mm) (**Naziri et al., 2012**). La résistance de ces bactéries peut être attribuée à la nature de la paroi de ces souches.



**Tableau 2** : Diamètres des zones d'inhibition (mm) entourant des extraits méthanolique et éthanolique de grenade (écorce et peau) en présence des souches pathogènes étudiées.

EMEG (mg/mL)	Souches bactériennes			
	<i>B.subtilis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
250	13.5±1.3	20.5±0.58	13.5±0.57	15.5±1.3
125	11.25±1.5	17.75±0.5	11.25±0.5	14.5±0.57
62.5	-	16.75±0.5	9±00	8.5±1
EMPG (mg/mL)				
250	16±0.82	15.25±0.96	11.5±0.75	10±0.82
125	14±0.81	15.25±0.5	10.25±0.5	8.5±0.57
62.5	10.25±0.81	12.75±0.5	-	6.25±0.5
EEEG (mg/mL)				
250	12.5±0.58	21.25±0.96	12.5±0.57	15.5±0.58
125	14.5±0.57	18.25±0.5	11.5±0.57	13.75±0.95
62.5	11.5±0.57	15.75±0.95	9.25±0.5	
EEPG (mg/mL)				
250	13.5±0.58	17±0	10.5±0.5	15.5±0.82
125	10.5±0.57	11.5±0.57	9.5±0.75	12.75±0.5
62.5	9.5±0.57	9.75±0.5	-	8.25±0.5
Antibiotiques				
Ticarcillin	-	21±0.5	23±1.15	-
Tetracycline	-	12±0	19±0.5	-

(Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± Écart-type des trois essais indépendants).  
 EEEG: extrait éthanolique d'écorce de grenade; EEPG: extrait méthanolique d'écorce de grenade ; EMEG; extrait méthanolique d'écorce de grenade; EMPG: extrait méthanolique de peau de grenade  
 - : absence de zone d'inhibition

#### II.4.2. Détermination des concentrations minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) par la méthode de microdilution

Les résultats d'évaluation de CMI et CMB par la méthode de microdilution (tableau 3) évoquent que les extraits phénoliques (éthanolique et méthanolique) de l'écorce et de la peau de grenade entraînent des degrés différents de l'activité antibactérienne.

L'effet inhibiteur des deux extraits de l'écorce sont plus puissant contre *B. subtilis* avec CMI de 3.9 mg/mL et CMB de 62.5 mg/mL suivie par *B.cereus* avec CMI de 7.81 mg/mL et CMB entre 62.5 et 125mg/mL. En comparaison avec les extraits issus de la peau de grenade, les CMI obtenus sont de l'ordre de 7.81 et 15.62 mg/mL respectivement et CMB de 62.5 mg/mL

**Tableau 3** : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) des extraits phénoliques d'écorce et peau de grenade (mg /ml) vis à vis des souches bactériennes testées.

Bactéries	CMI				CMB			
	EEEG	EEPG	EMEG	EMPG	EEEG	EEPG	EMEG	EMPG
<i>B.cereus</i>	7.81	15.62	7.81	15.62	125	-	62.5	-
<i>B. subtilis</i>	3.9	7.81	3.9	7.81	62.5	62.5	31.25	62.5
<i>E. coli</i>	15.62	15.62	15.62	15.62	62.5	125	62.5	62.5
<i>P. aeruginosa</i>	15.62	15.62	15.62	15.62	250	250	250	-

(Les valeurs exprimées en mg/ml).

EEEG: extrait éthanolique d'écorce de grenade; EEPG: extrait méthanolique d'écorce de grenade;

EMEG; extrait méthanolique d'écorce de grenade; EMPG: extrait méthanolique de peau de grenade.

Cependant, l'effet inhibiteur des extraits de peau et de grenade sont comparable contre les bactéries Gram négative *E. coli* et *P. aeruginosa* avec CMI de 15.62 et CMB entre 62.5 et 250 mg/mL

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Naziri et al., (2012)**, qui ont remarqué que l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade exerce un effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries Gram positives par rapport à celles des bactéries à Gram négatif. De ce fait, la CMI de l'extrait de l'écorce de grenade déterminée par la méthode de dilution sur milieu liquide contre *E. coli* est de 31,3 mg/mL, et de 7,8 mg/mL vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Ceci confirme les résultats de **Naz et al. (2007)**. Ces auteurs ont étudié, in vitro, l'effet de différents extraits d'écorce de grenade sur six espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*. Ils ont montré que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne, quel que soit l'espèce bactérienne cultivée (**Gullon et al., 2015**).

Dans une autre étude réalisée par de **Reddy et al. (2007)** sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits issus d'écorce de grenade présentent une activité significative contre *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *S.aureus*. Aussi **Al-Zoreky, (2009)** a démontré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un inhibiteur puissant sur la croissance de *Listeria monocytogenes*, *S.aureus*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*.

Cette activité antimicrobienne des extraits est due, principalement, à sa composition phytochimique, et en particulier, à la nature de ses composés phénoliques majoritaires comme les tanins et les polyphénols, en particulier la punicalagine et l'acide ellagique, respectivement (**Tehranifar et al., 2011**). Elle peut être attribuée, aussi, à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans l'extrait (**Mphahlele et al., 2016**). De nombreux travaux ont démontré la corrélation entre l'activité antibactérienne et le profil chimique d'un extrait phénolique d'écorce de grenade. **Prashanth et al. (2001)** ont démontré que différents composés phénoliques extraits d'écorce de grenade sont obtenus en fonction du solvant utilisé. Ainsi, en utilisant comme solvant l'eau à température ambiante il y aura isolement des tannins et d'autres composés phénoliques, tandis qu'avec le méthanol, des tannins et des alcaloïdes sont extraits. Dans une investigation réalisée par **Nozohour, (2018)** ont démontré que les extraits aqueux, éthanoliques et butanoliques de grenade ont des activités antibactériennes contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* résistant à la méthicilline. Le mécanisme d'inhibition des composés polyphénoliques, y compris les polyphénols hydrolysables, les principaux composants de l'écorce de grenade, sont associés à la précipitation des protéines de la membrane cellulaire des bactéries par la réaction des composés phénoliques d'écorce de grenade entraînant la lyse des cellules bactériennes (**Akhtar et al., 2015**). De même, les composés phénoliques peuvent réagir avec les groupes sulfhydryles de protéines et les rendre indisponibles pour la croissance microbienne, générant ainsi une toxicité phénolique (**Haslam, 1996**).

# Conclusion et Perspectives

## Conclusion

---

Le fruit de grenadier (*Punica granatum* L.) ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs sont utilisés dans la médecine traditionnelle depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales thérapeutiques. Dans ce contexte, cette présente étude s'intéresse à étudier l'effet des solvants d'extraction (Ethanol ou Méthanol) sur la teneur en composés phénoliques de deux parties de grenade (*Punica granatum* L.), ainsi d'évaluer leur influence sur les propriétés antioxydantes et antibactériennes.

Les résultats obtenus indiquent que le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques, pour les deux parties étudiées, où le rendement d'extrait méthanolique de l'écorce et de peau de grenade estime à 41% et 55.66% respectivement par rapport aux extraits éthanoliques avec un taux de 23.06% pour l'écorce et 31.79% pour la peau de grenade. En ce qui concerne la teneur en composés phénoliques des extraits de peau et d'écorce il en ressort que les écorces sont plus riches en polyphénols que les peaux de fruit de grenade où il présente  $379.65 \pm 28.41$  mg EAG/g MS pour l'extrait méthanolique de l'écorce et  $190.75 \pm 6.54$  mg EAG/g MS pour l'extrait méthanolique de la peau de grenade aussi pour l'extrait éthanolique de l'écorce de grenade a également montré un contenu élevé, dont lequel il est estimé à  $414.41 \pm 26.14$  mg EAG/g MS alors que l'extrait éthanolique de la peau de grenade est estimé à  $74.85 \pm 4.66$  mg EAG/g MS. et de même les extraits d'écorce sont plus riche en flavonoïdes que la peau ( $50.88 \pm 6.43$  mg EQ/g MS et  $3.50 \pm 0.27$  mg EQ /g MS, respectivement ) et va de même pour l'extrait éthanolique issu d'écorce et de peau de fruit de grenade où enregistrées respectivement  $12.16 \pm 0.23$  mg EQ/g MS  $4.89 \pm 0.37$  mg EQ/g MS.

Cependant, L'extrait éthanolique de deux parties de grenade présente un fort pouvoir réducteur plus élevé en comparaison à celui obtenu par l'extrait méthanolique. Parallèlement, les deux extraits de l'écorce exercent un effet inhibiteur puissant contre *B. subtilis* avec CMI de 3.9 mg/mL et CMB de 62.5 mg/mL suivie par *B.cereus* avec CMI de 7.81 mg/mL et CMB entre 62.5 et 125mg/mL. En comparaison avec les extraits issus de la peau de grenade, les CMI obtenus sont de l'ordre de 7.81 et 15.62 mg/mL respectivement et CMB de 62.5 mg/mL. Tandis que, l'effet inhibiteur des extraits de peau et de grenade sont comparable contre les bactéries Gram négative *E. coli* et *P. aeruginosa* avec CMI de 15.62 et CMB entre 62.5 et 250 mg/mL.

L'ensemble des résultats obtenus permet de suggérer la possibilité d'utiliser les extraits d'écorce de grenade comme solution alternative aux antibiotiques et de la présenter comme un antioxydant / prébiotique et ce afin de lutter contre certaines maladies comme les troubles gastro-intestinaux, les ulcères d'estomac, et cancer.

## Conclusion

---

Cependant, pour consolider ces résultats plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Il est fort intéressant de:

- ✓ Identifier les composés bioactifs des extraits de deux parties de grenade par l'utilisation de HPLC /ms et étudier leurs structures pour mettre le point sur ceux dotés d'activités biologiques.
- ✓ Evaluer l'activité antioxydante par la méthode de DPPH
- ✓ Déterminer l'activité anti-inflammatoire et anti-cancéreuse des extraits de grenade

Références  
Bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### A

- **Adeskon A. A., Akanji M. A., Yakubu M. T., (2007).** Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark African Journal of Biothenology 6, 2502-2505.
- **Ali-Shtayeh M. S., Yaghmour R. M., Faidi Y. R., Salem K., Al-Nuri M. A., (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. Journal of Ethno pharmacology, 60, 265- 271.
- **Al-Saeed M. H., Othman R. M., AL-Saeed A. H., 2015.** L'effet de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Punica granatum* sur la guérison des plaies infectées de champignons chez les lapins: AL-Qadisiya Journal of Vet. Med. Sci, 14(1), 109-117.
- **Al-Zoreky N. S., (2009).** International Journal of Food Microbiology, 134, 244–248.
- **Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S. E., Bektasoglu B., Berker K. I., et Özyurt D., (2007).** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules, 12 (7), 1496-1547.

### B

- **Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C., and Pinkas M., (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from haw thorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46 (11), 1086-1089.
- **Barry A. L., Thornsberry C., (1985).** Susceptibility test, diffusion test procedure, *American Journal of Clinical Pathology*, 19, 492-500.
- **Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris T. C., Truck M., (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- **Bourgou S., Serairi B. R., Medini F., Ksouri R.(2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of new sciences*, 32, 1649-1655.

### C

- **Cherane H., Mansori M., Latique S., EL Kaoua M., (2014).** Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and its solvent fractions obtained from four Moroccan macro algae species. *European Scientific Journal*, 10 (15), 35- 48.
- **Cowan M. M., (1999).** Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.



## References bibliographiques

---

### *D*

- **Derakhshan Z., Ferrante M., Tadi M., Ansari F., Heydari A., Hosseini M. S., et al., (2018).** Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 108–111.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J. F., Stocker P., (2006).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolics compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol*, 224, 801–809.
- **Doughari J. H., Pukuma M. S., De N., (2007)** Antibacterial effects of *Balanites Aegyptiaca* L., *Drel* and *Moringa Oleifera* Lam., on *Salmonella typhi*. *Afr. J. Biotechnol.*, 6(19), 2212–2215.
- **Danial N., Basudan N., (2019).** Comparative study as antioxidant, antimicrobial activities and total phenolic content between various parts of pomegranate. *Research Journal of Life Science, Bioinformations, Pharmaceutical and Chemical science*, 5(2), 675.

### *E*

- **Escribano-Bailón M. T., et Santos-Buelga C., (2003).** Polyphenols extraction from foods. In *Methods in polyphenol analysis*. Royal Society of Chemistry, 1-16.

### *F*

- **Fawole O. A., Umezuruike L., Opara K. I., (2012)** Chemical and phytochemical properties and antioxidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa. *Food Bioprocess Technology*, 7, 2934–2940.
- **Felhi S., Daoud A., Hajlaoui H., Mnafigui K., Gharsallah N., Kadri A., (2017).** Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits. *Food Science and Technology*, 37, 1-10.
- **Fernandes L., Casal S., Pereira J. A., Saraiva J. A., Ramalhosa E., (2017).** Edible flowers: a review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal Food Composition and Analysis*, 60, 38–50.
- **Fiorucci S., (2006).** Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de Doctorat, université de Nice-Sophia Antipolis, Nice (France), 211.

## References bibliographiques

---

### G

- **Gaur R. K., (2017).** Antibiotic resistance: alternative approaches. *Indian Journal Pharmacology*, 49, 208-210.
- **Gil M. I., Tomàs-Barberà F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M., Kader A. A., (2000).** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 4581–4590.
- **Ghasemzadeh A., Hawa Z., Jaafar E., et Asmah R., (2011).** Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (7), 1147-1154.
- **Gil M. I., Tomàs-Barberà F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M., Kader A. A., (2000).** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48, 4581–9.
- **Gullon B., Pintado M. E., Perz-alvarez J. A., Viuda marto M., (2015).** Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co product of juice extraction. *Food control*, 59, 1-20.

### H

- **Hadrich F., Cherif S., Talel Gargouri Y., et Sayari A., (2014).** Antioxydant and Lipase inhibitory Activities and Essential Oil Composition of Pomegranate peel Extract. *Journal of Oleon science*, 63, (5), 515-525.
- **Haslam E., (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.

### J

- **Johanningsmeier S. D., Harris G. K., (2011).** Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 181-201.
- **Jalal Heena., Mohammad Ashraf Pal., Henna Hamdani., Mir Rovida and Nursat Nabi Khan., (2018).** Antioxidant activity of pomegranate peel and seed powder extracts, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 992-997

### K

- **Kim N. D., Mehta R., Yu W., Lansky E., (2002).** Chemo preventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71, 203–217.

## References bibliographiques

---

- **Kumar M., Dandapat S., Kumar A and Sinha M. P., (2013)**, Growth Inhibitory impact of *Adhatoda vasica* and *Vitex negundo* on some human pathogens, *The Ecoscan Special issue*, (4), 241 – 246.
- **Kusuma I., Murdiyanto W., Arung E. T., Syafrizal Kim YU., (2014)**. Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. *Food Science and Human Wellness*, 3, 191-196.
- **Klancnik A., Piskernik S., Jersek B., Mozina S. S., (2010)**. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 121-126.

### ℒ

- **Lee J. S., Choi M. S., Jeon S. M., Jeong T. S., Park Y. B., Lee M. K., et Bok S. H., (2003)**. Lipid-lowering and antioxidative activities of 3,4-di(OH)-cinnamate and 3,4- di(OH)-hydrocinnamate in cholesterol-fed rats. *Clin Chim Acta*, 314, 221-9.
- **Li Y., Guo G., Yang J., Wei J., Xu J., and Cheng S., (2006)**. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.

### ℳ

- **Mphahlele R. R., Fawole O. A., Opara U. L., (2016)**. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complementary Medicine and Therapy*, 16, 1-12.
- **Malviya S., Jha A., & Hettiarachchy N., (2014)**. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4132-4137.
- **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. *Journal. Science. Food Agriculture*, 91, 1893–1906.

### ℒ

- **Naziri Z., Rajaian Hand Firouzi R., (2012)**. Antibacterial effects of Iranian native sour and sweet pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts against various pathogenic bacteria. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, 13, (41), 282-288.
- **Naz S., Siddiqi R., Ahmad S., Rasool S., Sayeed S., (2007)**. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, 7, 341–345
- **Nozuhour Yaser., Reza Golmohammadi., Reza Mirnejad., Majid Fartashvand., (2019)**. Antibacterial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed and Peel Alcoholic Extracts on

## References bibliographiques

---

Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa Isolated From Health Centers. Journal of Applied Biotechnology Reports, 5(1), 32-36.

### O

- **Ouelbani R., Bensari S., Mouas T. N., Douadi K., (2016).** Ethanolical investigations on plants used in folk medicine in the region of Constantine and Mila (North-East of Algeria) Journal of Ethnopharmacology, 194, 196-218.
- **Oyaizu M., (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.

### P

- **Prashanth D., Asha M. K., and Amit A., (2001).**Antibacterial activity of Punica granatum. Fitoterapia, 72, 171-173.

### R

- **Reddy M. K., Gupta S. K., Jacob M. R., Khan S. I., & Ferreira D., (2007).** Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. Planta Medica, 73, 461-467.

### S

- **Shiban M. S., Al otaibi M. M., Al Zoreky N. S., (2012).** Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. Food and Nutrition Sciences, 3, 991- 996.
- **Seidel V., (2005).** Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds. Humana Press (Totowa), 27-37.
- **Singh R. P., Murthy K. N. C., & Jayaprakasha G. K., (2002).** Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. Journal. Agriculture. Food Chemistry, 50, 81-86.
- **Singleton V., Orthofer R., et Lamuela-Raventos R., (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteau reagent. Methode of enzymologie, 299, 152-178.

## References bibliographiques

---

### T

- **Tehranifar A., Selahvarzi Y., Kharrazi M., et Jahan Bakhsh V., (2011).** High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1523- 1527.

### Z

- **Zaki H. A., Abdelatif S. H., Abdelmohsen N. R., Ismail F. A., (2015).** Phenolic compounds and antioxidant activities of pomegranate peels .*International Journal of Food Engineering*, 1, 73-76.
- **Zaouay F. P., Mena C., Garcia-Viguera., Mars M., (2012).**Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 40, 81-89.
- **Zhu C., & Liu X., (2013).** Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Pomegranate peels by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 92(2),1197–1202.

# Annexes

### Annexe I

#### Composition des milieux de cultures utilisés

- **Gélose nutritive:**

Pour 1 litre de milieu:

Tryptone.....	5,0g
Extrait de viande.....	1,0g
Extrait de levure.....	2,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Agar agar.....	12,0g

(Delarras, 2007).

- **Gélose de Mueller-Hinton**

Pour 1 litre de milieu :

Infusion de viande de bœuf.....	300g
Hydrolysate de caséine .....	17,0g
Amidon .....	1,5g
Gélose.....	17g

(Delarras, 2007).

Annexe II

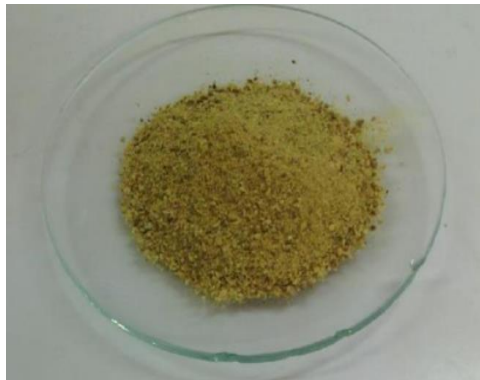
Différentes parties de *Punica granatum* L.



Fruit de *Punica granatum* L.  
(grains)



Poudre de peau de fruit de *Punica granatum* L.



Poudre de l'écorce de fruit de *Punica granatum* L.



Fruit de *Punica granatum* L.

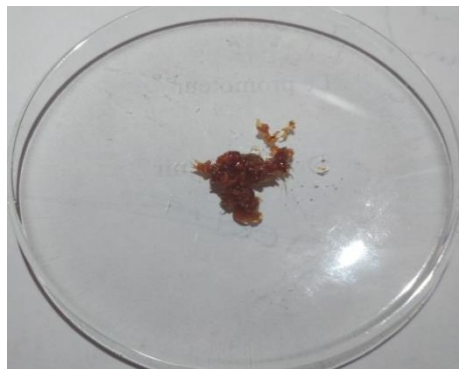


**Annexe III**

**Extraits secs de l'écorce et de la peau de grenade obtenus**



Extrait éthanolique de l'écorce



Extrait méthanolique de l'écorce



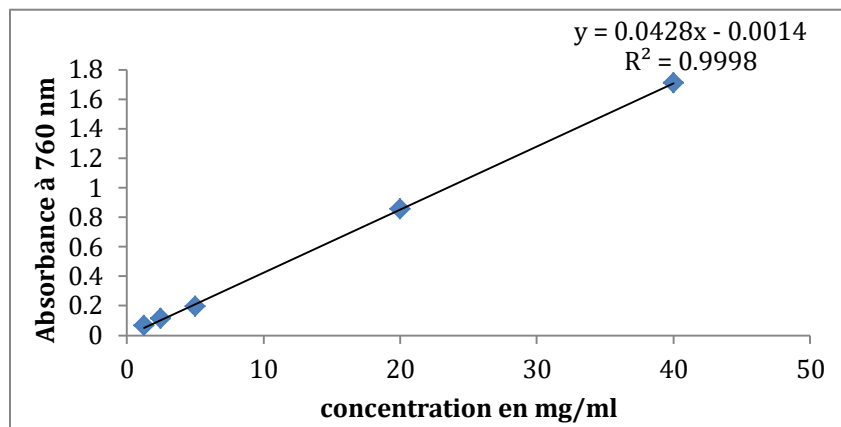
Extrait éthanolique de la peau



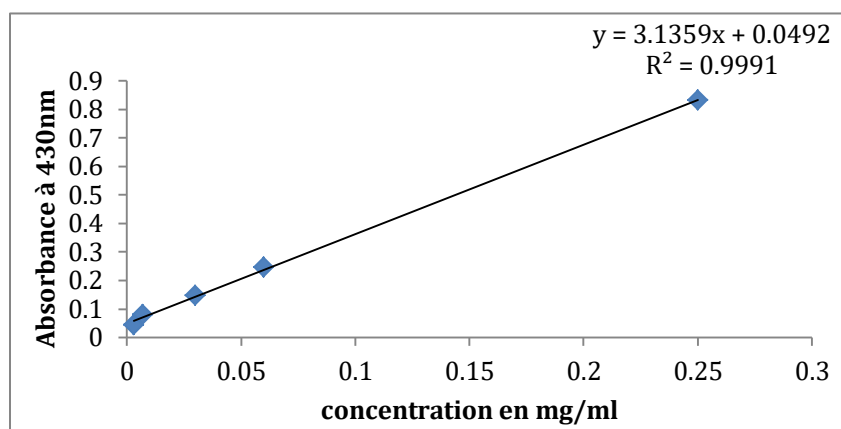
Extrait méthanolique de la peau

Annexe IV

**Courbes d'étalonnage pour les composés phénoliques et flavonoïdes  
d'écorce et peau de grenade**



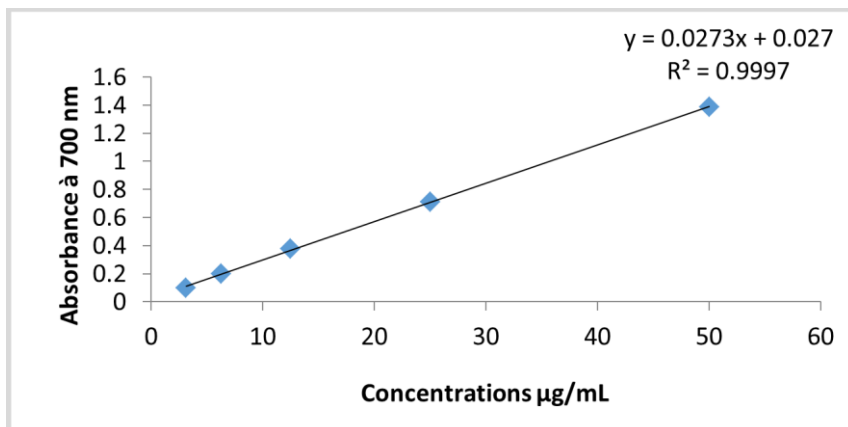
Courbe d'étalonnage quercétine (mg/ml)



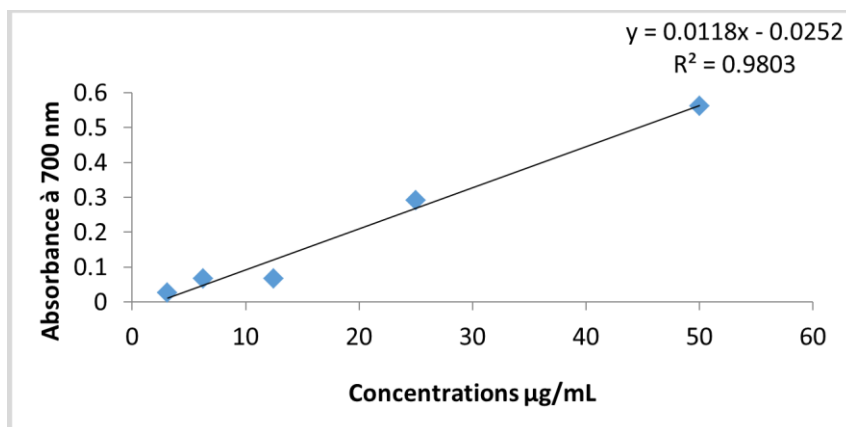
Courbe d'étalonnage acide gallique (mg/ml)

Annexe V

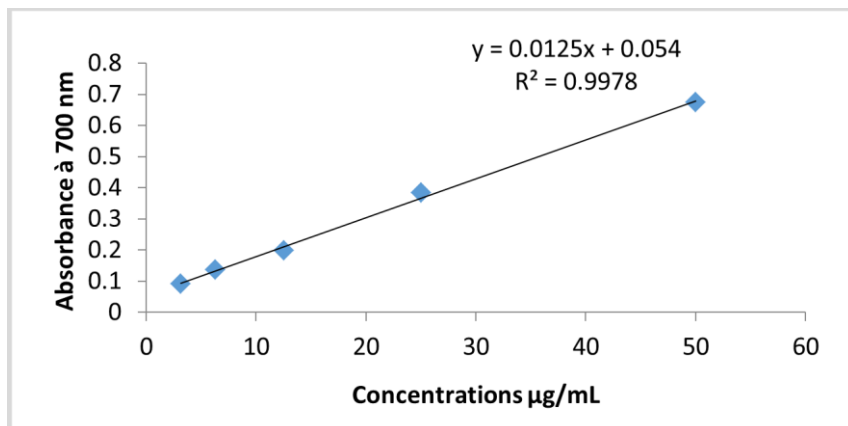
Courbes d'étalonnage pour l'activité antioxydante des extraits phénoliques d'écorce et de peau de grenade



Courbe d'étalonnage acide gallique ( $\mu\text{g/ml}$ )



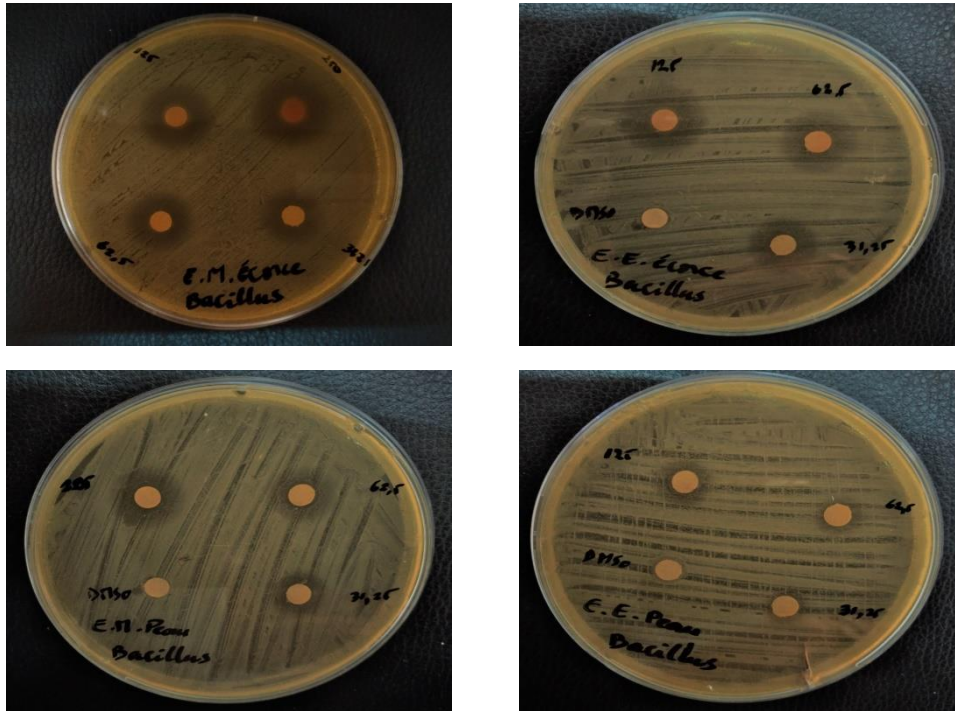
Courbe d'étalonnage acide ascorbique ( $\mu\text{g/ml}$ )



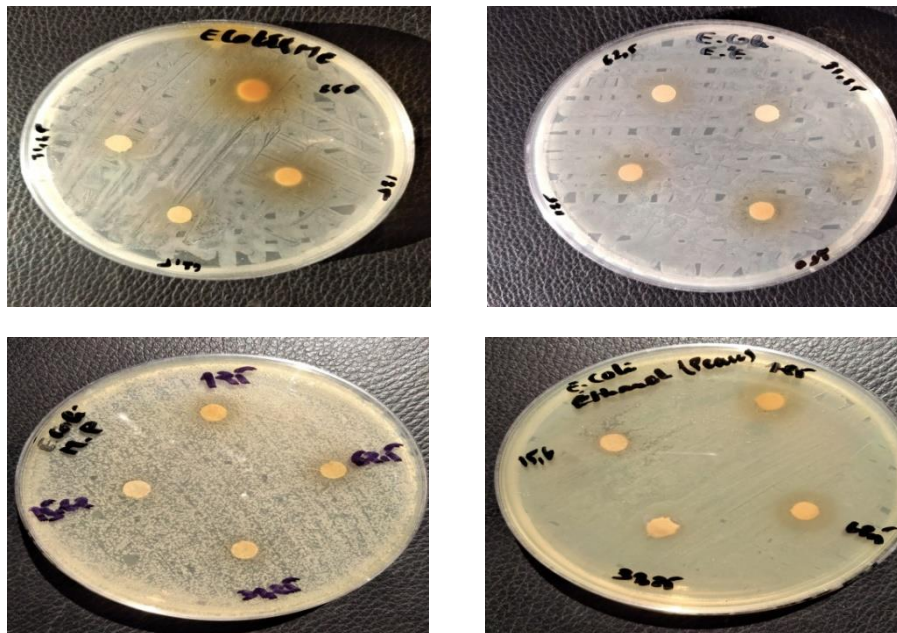
Courbe d'étalonnage quercétine ( $\mu\text{g/ml}$ )

Annexe VI

VI.1. Effets des extraits éthanoliques et méthanoliques de l'écorce et de la peau de grenade vis-à-vis des souches bactériennes testées

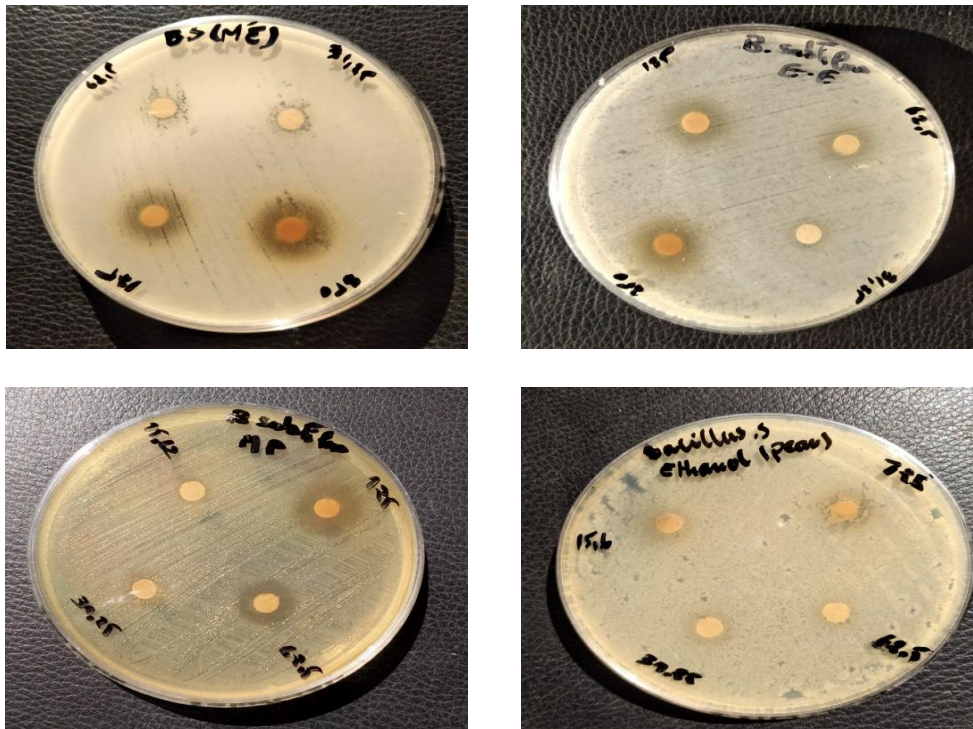


Effets des extraits (éthanolique et méthanolique) de peau, d'écorce de grenade et de DMSO sur *B. cereus*



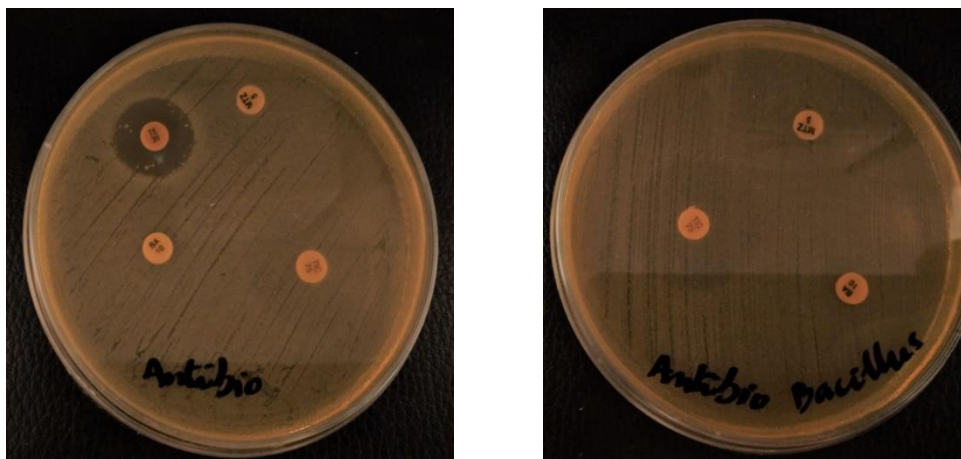
Zones d'inhibition par l'extrait (éthanolique et méthanolique) de peau, d'écorce de grenade et de DMSO vis-à-vis *E. coli*.





Zones d'inhibition par l'extrait (éthanolique et méthanolique) de peau, d'écorce de grenade et de DMSO vis-à-vis *B. subtilis*.

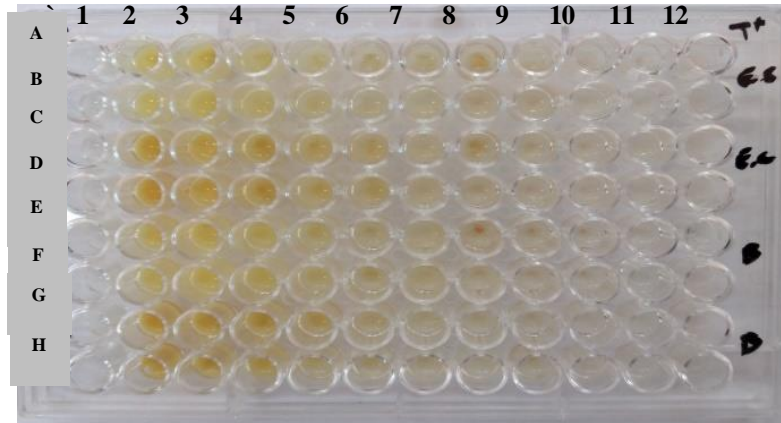
## VI.2. Effets des antibiotiques vis-à-vis des souches testées



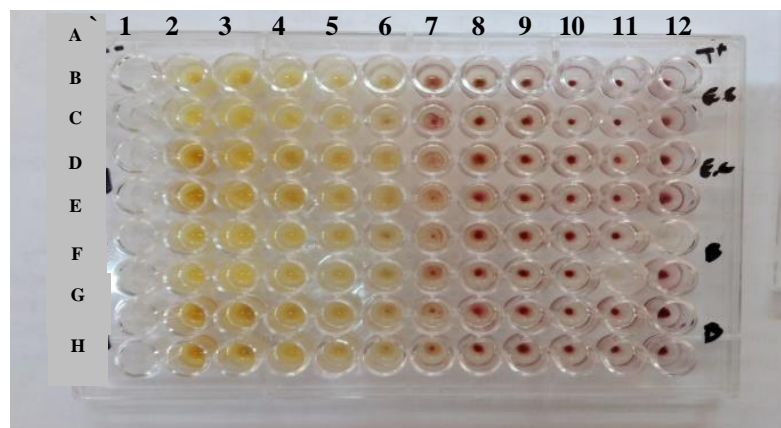
Effets des antibiotiques sur les souches bactériennes

Annexe VII

Activité antibactérienne des extraits éthanoliques et méthanoliques d'écorce et de peau de grenades vis-à-vis des souches pathogènes



Activité antibactérienne des extraits de peau de grenade vis-à-vis *E. coli* et *B.subtilis* avant l'incubation



Activité antibactérienne des extraits de peau de grenade vis-à-vis *E. coli* et *B.subtilis* après l'incubation de 18h à 37°C= révélateur TTC

**Colonne (1 à 12) ligne A:** Milieu Muller Hinton (MH) + (*E. coli* /*B.subtilis*) (témoins positif)

**Colonne (1) ligne (A à H):** Milieu Muller Hinton (témoins négatif)

**Colonne (2 à 11) ligne A et B:** MH+ *E. coli*+ extrait éthanolique de peau de grenade(EEPG) 250mg/ml; 125mg/ml; 62.5mg/ml; 31.25mg/ml; 15.62mg/ml; 7.81mg/ml; 3.9 mg/ml; 1.95mg/ml; 0.97 mg/ml; 0.48 mg/ml.

**Colonne (2 à 11) ligne C et D:** MH+ *E. coli*+ extrait méthanolique de peau de grenade(EEPG) 250mg/ml; 125mg/ml; 62.5mg/ml; 31.25mg/ml; 15.62mg/ml; 7.81mg/ml; 3.9 mg/ml; 1.95mg/ml; 0.97 mg/ml; 0.48 mg/ml.

**Colonne (2 à 11) ligne E et F:** MH+ *B.subtilis* + extrait éthanolique de peau de grenade(EEPG) 250mg/ml; 125mg/ml; 62.5mg/ml; 31.25mg/ml; 15.62mg/ml; 7.81mg/ml; 3.9 mg/ml; 1.95mg/ml; 0.97 mg/ml; 0.48 mg/ml.

**Colonne (2 à 11) ligne G et H:** MH+ *B.subtilis* + extrait méthanolique de peau de grenade(EEPG) 250mg/ml; 125mg/ml; 62.5mg/ml; 31.25mg/ml; 15.62mg/ml; 7.81mg/ml; 3.9 mg/ml; 1.95mg/ml; 0.97 mg/ml; 0.48 mg/ml.

### Résumé

Depuis l'Antiquité, les produits naturels dérivés des plantes sont utilisés pour prévenir ou traiter diverses maladies. De nos jours, ces bio ressources naturelles ont fait l'objet d'une attention particulière de la part de la communauté scientifique. Dans cette optique, la présente étude vise à analyser le contenu phénolique total in Vitro et les activités antibactérienne et antioxydante des extraits à l'éthanol et au méthanol de deux parties de grenade (peau et écorce). L'activité antioxydante a été évaluée par la technique FRAP et la teneur phénolique en utilisant la méthode Folin Ciocalteu. Activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose et microdilution. Les résultats obtenus de l'analyse phytochimique des composés phénoliques révèlent que les écorces sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes que les peaux de fruit de grenade. Ainsi l'extrait éthanolique de deux parties de grenade présente un fort pouvoir réducteur plus puissant en comparaison à celui obtenu par l'extrait méthanolique. Parallèlement, les résultats de l'activité antibactérienne dévoilent que les deux extraits d'écorce exercent un effet inhibiteur puissant contre *B. subtilis* avec CMI de 3.9 mg/mL et CMB de 62.5 mg/mL suivie par *B.cereus* avec CMI de 7.81 mg/mL et CMB entre 62.5 et 125mg/mL. En comparaison avec les extraits issus de la peau de grenade, les CMI obtenus sont de l'ordre de 7.81 et 15.62 mg/mL , respectivement et CMB de 62.5 mg/mL. Tandis que, l'effet inhibiteur des extraits de peau et de grenade sont comparable contre les bactéries Gram négative *E. coli* et *P. aeruginosa* avec CMI de 15.62 et CMB entre 62.5 et 250 mg/mL.

**Mots clés:** *Punica granatum* L., Composés phénoliques, Activité antioxydante, Activité antibactérienne, Ecorce, Peau.

### ملخص

منذ العصور القديمة ، تم استخدام المنتجات الطبيعية المشتقة من النباتات للوقاية من الأمراض المختلفة أو علاجها. في الوقت الحاضر، حظيت هذه الموارد الحيوية ذات المصادر الطبيعية باهتمام خاص من المجتمع العلمي. مع أخذ ذلك في الاعتبار ، تهدف الدراسة الحالية إلى تحليل المحتوى الفينولي الكلي في المختبر والأنشطة المضادة للبكتيريا ومضادات الأكسدة لمستخلصات الإيثانول والميثانول لجزيئين من الرمان (قشر ولحاء). تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام تقنية FRAP والمحتوى الفينولي باستخدام طريقة Folin Ciocalteu. تم تحديد نشاط مضادات الميكروبات من خلال طريقة انتشار الأجار وطريقة التخفيف الدقيق. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من التحليل الكيميائي النباتي للمركبات الفينولية أن القشور أكثر ثراءً في البوليفينول والفلافونويد من لحاء ثمار الرمان. وبالتالي فإن المستخلص الإيثانولي لجزيئين من الرمان له قوة اختزال قوية أقوى مقارنة بتلك التي حصل عليها المستخلص الميثانولي. في الوقت نفسه ، كشفت نتائج النشاط المضاد للبكتيريا أن مستخلصي اللحاء لهما تأثير مثبط قوي ضد بكتيريا *B. subtilis* مع MIC البالغ 3.9 مجم / مل و CMB من 62.5 مجم / مل تليها بكتيريا *B. cereus* مع CMI. 7.81 مجم / مل و CMB بين 62.5 و 125 مجم / مل. بالمقارنة مع المستخلصات من قشر الرمان، فإن MICs التي تم الحصول عليها هي من 7.81 و 15.62 مجم / مل على التوالي و CMB 62.5 مجم / مل. في حين أن التأثير التنبطي لمستخلصات قشر الرمان يمكن مقارنته مع البكتيريا سالبة الجرام *E. coli* و *P. aeruginosa* مع MIC من 15.62 و CMB بين 62.5 و 250 مجم / مل.

الكلمات الدالة: *Punica granatum* L.، مركبات الفينول، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للجراثيم، اللحاء، قشر الرمان.