



Institut des  
Sciences  
Vétérinaires- Blida

Université Saad  
Dahlab-Blida 1-



Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme

**MASTER**

En Sciences Vétérinaires

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS  
DU FRUIT *PUNICA GRANATUM L* SUR DES SOUCHES  
D'ENTEROCOQUES MULTIRESISTANTES**

Présenté par

ABDELLAOUI Hicham et ZERNANA Abir

Devant le jury :

<b>Président :</b>	AOURAGH, H	MAA	ISV Blida
<b>Examineur :</b>	MEKADEMI, K	DV	ISV Blida
<b>Promotrice :</b>	YOUSFI, S	MCB	ISV Blida
<b>Co-promoteur :</b>	HAMMAMI, N	MCA	ISV Blida

**Année : 2020/2021**

# Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH tout-puissant de nous avoir donné la force, le courage ainsi que la volonté pour mettre en œuvre ce travail.

En second lieu nous souhaitons exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice Madame YOUSFI Safia Maitre de conférence B, à l'Institut des Sciences vétérinaires de l'Université de Blida -1-, pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour ses précieux conseils et son appui scientifique tout au long de cette période, enfin pour sa disponibilité qui nous ont permis de mener à terme ce travail.

Nos sincères remerciements,

A notre Co-promotrice Mme HAMMAMI Nabila, Maitre de Conférences A, chaleureux remerciements.

Nous remercions également,

Madame AOURAGH, H, pour avoir accepté de présider le jury, ainsi que,

Madame MEKADEMI, K, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Sans oublier tous les enseignants de l'Institut des Sciences Vétérinaires à Blida qui nous ont encadrés durant notre cursus.

Nous remercions également les responsables du laboratoire LBRA de l'Institut de nous avoir donné l'accès pour réaliser la partie expérimentale.

Nous avons une infinie liste d'amis à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida et nous ne ferons pas le pari de les énumérer sans risque d'en omettre certains. Nous nous astreignons à un devoir de reconnaissance à l'égard de tous.

# *Dédicaces*

Je dédie ce modeste travail,

A mes chers parents, sources de mes joies, secrets de ma force. Vous serez toujours le modèle à suivre. Maman, dans ta détermination, ta force et ton honnêteté, sans toi je ne serai jamais devenue celle que je suis aujourd'hui. Papa, dans ta bonté et ton dévouement pour nous. Merci pour tous vos sacrifices pour moi. Merci d'être tout simplement mes parents c'est à vous que je dois cette réussite et je suis fière de vous l'offrir.

A mon ami et binôme Hicham ; pour ton aide, ton soutien, ta patience pour tous les moments difficiles qu'on a pu rencontrer durant notre parcours.

***Abir***

# *Dédicaces*

Avec l'expression de ma reconnaissance je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrasses, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A L'homme, mon précieux offre du dieu qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non âmes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureux : mon adorable mère.

A mon cher frère Amin Bernoussi, a tous les moments passes avec toi mon frère, engage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé.

A mes amis Anis, Adel, Soufiane, Marwa, Sofia, Titem et Rayan. Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de sante et de bonheur.

A tous mes cousins : Amin, Mohamed, Mounir merci pour leurs amours et leurs encouragements.

Sans oublier mon binôme Abir pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet et durant les Cinq années.

***Hicham***

## Résumé

L'objectif de ce travail est la détermination de la composition chimique des extraits du fruit du *Punica granatum L*, ainsi que leurs activités antimicrobiennes envers des souches d'entérocoques multirésistantes.

La teneur totale en phénols des extraits a été déterminée par analyse HPLC. Les composés phénoliques présents dans les trois extraits étudiés étaient des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavonoïdes identifiés sont la quercitine, le résorcinol, l'épicatéchine et la berbérine.

Pour les acides phénoliques, l'acide vanillinique et l'acide trans-cinamique et l'acide salicylique ont été identifiés dans l'extrait aqueux. En revanche, nous avons trouvé de l'acide syringique, de l'acide manisique et de l'acide salicylique dans l'extrait méthanolique. Alors que dans l'extrait éthanolique, nous n'avons trouvé que de l'acide 3-hydroxy-4-méthoxy cinamique.

Nous avons également identifié dans l'extrait aqueux l'oleuropéine, un ortho-diphénol très fréquemment identifié dans l'olive.

Pour l'activité antibactérienne, la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton a été utilisée. Les extraits éthanolique et méthanolique possédaient une activité antibactérienne contre les deux souches testées.

**Mots clés :** Activité antibactérienne, *Enterococcus spp*, HPLC, extraits naturels, *Punica Granatum L*.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو تحديد التركيب الكيميائي لمستخلصات ثمار *Punica granatum L* ، وكذلك تحديد أنشطتها المضادة للميكروبات ضد سلالات متعددة المقاومة من المكورات المعوية. تم تحديد محتوى الفينول الكلي للمستخلصات عن طريق تحليل HPLC. كانت المركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات الثلاثة المدروسة هي الفلافونويد والأحماض الفينولية. مركبات الفلافونويد التي تم تحديدها هي كيرسيتين وريسورسينول وإبيكاتشين وبربارين. بالنسبة للأحماض الفينولية ، تم تحديد حمض الفانيلينيك وحمض ترانس-سيناميك وحمض الساليسيليك في المستخلص المائي. في المقابل ، وجدنا حمض السرينجيك وحمض المانيسيك وحمض الساليسيليك في مستخلص الميثانول. بينما في المستخلص الإيثانولي وجدنا فقط 3-هيدروكسي-4-ميتوكسي سيناميك حمض. لقد حددنا أيضًا في المستخلص المائي الأوليوروبين ، وهو أورثو ديفينول كثيرًا ما يتم التعرف عليه في الزيتون.

للنشاط المضاد للبكتيريا ، تم استخدام طريقة انتشار أجار مولر-هينتون. تمتلك المستخلصات الإيثانولية والميثانولية نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد السلالتين المختبرتين.

**الكلمات المفتاحية :** النشاط المضاد للبكتيريا ، *Enterococcus spp* ، HPLC ، المستخلصات الطبيعية ، *Punica Granatum L*

## Abstract

The objective of this work is the determination of the chemical composition of the extracts of the fruit of *Punica granatum L*, as well as the determination of their antimicrobial activities against multi-resistant strains of enterococci.

The total phenol content of the extracts was determined by HPLC analysis. The phenolic compounds present in the three extracts studied were flavonoids and phenolic acids. The flavonoids identified were quercetin, resorcinol, epicatechin and berberine.

For phenolic acids, vanillic acid and trans-cinamic acid and salicylic acid were identified in the aqueous extract. In contrast, we found syringic acid, manisic acid and salicylic acid in the methanolic extract. While in the ethanolic extract, we found only 3-hydroxy-4-methoxy cinamic acid.

We also identified in the aqueous extract oleuropein, an ortho-diphenol very frequently identified in olive.

For antibacterial activity, the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar was used. The ethanolic and methanolic extracts possessed antibacterial activity against the two strains tested.

**Keywords:** Antibacterial activity, *Enterococcus spp*, HPLC, Natural extracts, *Punica Granatum L*.

## Liste des figures

	<b>Titre des figures</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1 :</b>	Arbre du grenadier ( <i>Punica granatum L.</i> )	2
<b>Figure 2 :</b>	Feuilles, fleurs et fruit de <i>Punica granatum L.</i>	2
<b>Figure 3 :</b>	Répartition géographique de la grenade en Afrique.	4
<b>Figure 4 :</b>	Les alcaloïdes de l'écorce de racine du grenadier, mis en évidence par Charles Tanret.	9
<b>Figure 5 :</b>	Feuilles lancéolées de <i>Punica granatum L.</i>	10
<b>Figure 6 :</b>	Fleurs aux sépales charnus et rouges et aux pétales froissés.	10
<b>Figure 7 :</b>	La grenade et ses différentes parties.	11
<b>Figure 8 :</b>	Structure de quelques composés phénoliques.	14
<b>Figure 9 :</b>	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.	15
<b>Figure 10 :</b>	Structures chimiques des acides hydroxycinamiques.	15
<b>Figure 11:</b>	Structure de base des flavonoïdes.	16
<b>Figure 12 :</b>	Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b).	17
<b>Figure 13:</b>	Structure des tanins hydrolysables.	18
<b>Figure 14:</b>	Structure des tanins condensés.	18
<b>Figure 15:</b>	Préparation du matériel végétal.	20
<b>Figure 16:</b>	Protocole expérimental de l'extraction des Polyphénols.	21
<b>Figure 17:</b>	Illustration de la méthode d'aromatogramme.	22
<b>Figure 18:</b>	Extraits de fruit de <i>Punica granatum L.</i>	24
<b>Figure 19:</b>	Aromatogramme d'une souche d'entérocoque.	24
<b>Figure 20:</b>	Profil Chromatographique des extraits du fruit <i>Punica granatum L.</i>	25
<b>Figure 21:</b>	Aromatogramme de <i>E.faecium</i> après 24h d'incubation à 37°C.	27
<b>Figure 22:</b>	Aromatogramme de <i>E.faecalis</i> après 24h d'incubation à 37°C.	27



## Liste des tableaux

	<b>Titre du tableau</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1 :</b>	Principales classes des flavonoïdes.	16
<b>Tableau 2 :</b>	Caractéristiques et origine des souches bactériennes cibles.	22
<b>Tableau 3 :</b>	Les composés phénoliques identifiés dans les extraits du fruit <i>Punica granatum L.</i>	26
<b>Tableau 4 :</b>	Diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits du fruit de <i>Punica granatum L.</i>	28

## Liste des abréviations

ADN	: Acide Désoxyribonucléique.
AGP	: Angiosperm Phylogeny Group.
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice.
CP	: Composés phénoliques.
HDL	: High Density Lipoprotein.
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance.
LDL	: Low Density Lipoprotein.
m	: Mètre.
mm	: Millimètre.
∅	: Diamètre.
%	: Pourcent.

# Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

## Synthèse bibliographique

### Chapitre 1 : Généralités sur *Punica granatum L*

1. Caractéristique botanique.....	2
2. Classification.....	2
3. Répartition géographique.....	4
4. Propriétés thérapeutiques de <i>Punica granatum L</i> .....	4
4.1. Activité antibactérienne .....	5
4.2. Activité antioxydante.....	5
4.3. Activité anti-inflammatoires.....	6
4.4. Activité anticancéreuse.....	6
4.5. Activité antidiabétique .....	7
4.6. Activité antiulcéreuse.....	8
4.7. Action cicatrisante .....	8
4.8. Autres propriétés .....	8
5. Composition chimique du fruit de <i>Punica granatum L</i> .....	8

### Chapitre 2 : Les composés phénoliques

1. Généralités.....	13
2. Structure et catégories des composés phénoliques.....	13
2.1. Polyphénols simples .....	14
2.1.1. Acides phénoliques .....	14

2.1.2. Les flavonoïdes .....	15
2.1.3. Alcools phénoliques .....	17
2.2. Polyphénols complexes (tannins) .....	17
3. Rôles et intérêts des composés phénoliques.....	19

### **Partie expérimentale**

1. Problématique.....	20
2. Objectifs.....	20
3. Matériel et méthodes.....	20
4. Résultats et discussion.....	24

<b>Conclusion</b> .....	29
-------------------------	----

<b>Références bibliographiques</b> .....	30
--	----

# Introduction

## Introduction

Les antibiotiques ont constitué une découverte thérapeutique importante pour la santé humaine. Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps. Cependant, le mauvais usage de ces agents antimicrobiens et leur utilisation accrue ont eu pour conséquence de faire apparaître certaines formes de résistances des souches microbiennes contrebalançant les effets des antibiotiques (Goosens *et al.* 2005).

L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne. Les plantes et leurs dérivés, tels que les huiles essentielles et les extraits de plantes, sont souvent utilisés dans la médecine populaire. Elles contiennent une grande variété de métabolites secondaires capables d'inhiber ou de ralentir la croissance des bactéries.

L'objectif de ce travail est de valoriser les extraits du fruit de *Punica granatum L.*, en étudiant leurs compositions chimiques et leurs propriétés antibactériennes envers des souches d'entérocoques multirésistantes.

Dans une première partie, une revue bibliographique sera présentée sur la plante étudiée qui est le grenadier. Une description détaillée, sa localisation géographique dans le monde, et son utilisation. Un second chapitre est consacré pour les composés phénoliques.

La deuxième partie du manuscrit présentera un chapitre sur le matériel et les méthodes utilisés, notamment la méthode d'extraction ainsi que l'analyse de la composition chimique des extraits du fruit de *Punica granatum L.*, et l'étude de leur activité antibactérienne par la méthode de l'aromatogramme. Enfin, les résultats obtenus ainsi que leurs discussions sont présentés dans le dernier chapitre.

# Synthèse bibliographique

# Chapitre 1:

## Généralités sur *Punica Granatum* L



## 1. Caractéristique botanique :

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon subsponnée ou cultivée (Garnier et Bezanger-Beauquesne, 1961).



**Figure 01** : Arbre du grenadier (*Punica granatum* L) (Source internet 1).



**Figure 02** : Feuilles, fleurs et fruit de *Punica granatum* L (Source internet 1).

## 2. Classification :

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Telle est cette classification :

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Myrtales
- Famille : *Punicaceae*
- Genre : *Punica*
- Espèce : *Punica granatum*

En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, est créée par un groupe de botanistes, l'Angiosperm Phylogeny Group ou APG. Cette classification phylogénétique réorganise le règne végétal en fonction de critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et d'un gène nucléaire de ribosome. Ainsi, pour certaines espèces végétales, les résultats moléculaires sont en accord avec les anciennes classifications alors que pour d'autres espèces végétales, il est nécessaire de modifier leur position dans la systématique. Ces résultats reconsidèrent la phylogénie des plantes. Cette nouvelle organisation se compose alors de 462 familles réparties dans 40 ordres (Spichiger *et al.*, 2004).

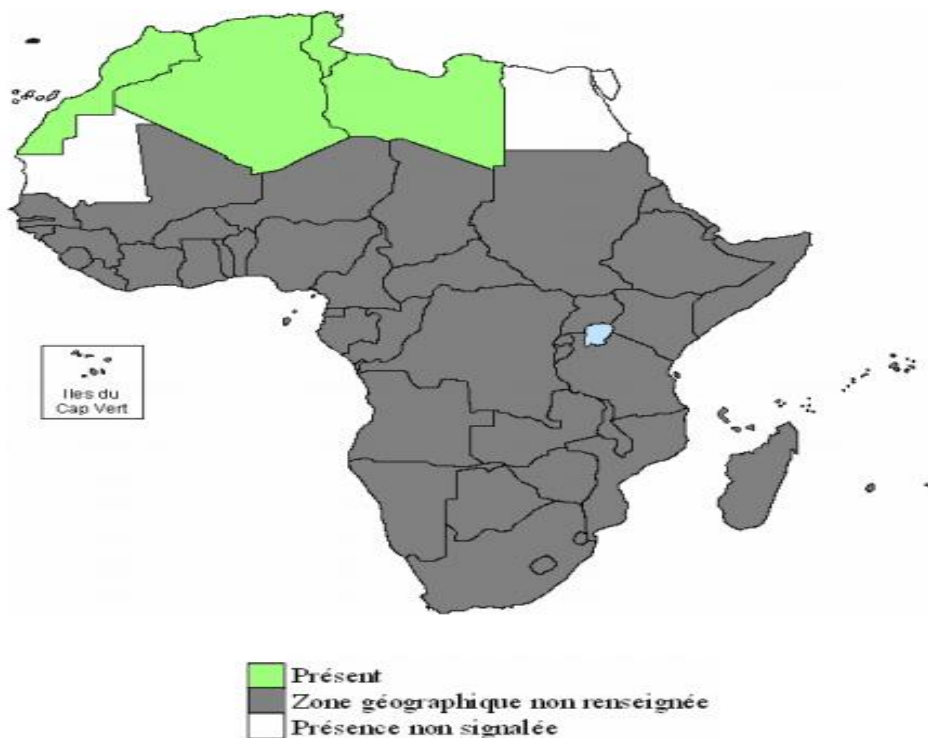
Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est :

- Clade : Angiospermes
- Clade : Dicotylédones vraies
- Clade : Rosidées<
- Ordre : Myrtales
- Famille : *Lythraceae*
- Genre : *Punica*
- Espèce : *Punica granatum*

Il convient donc de retenir que dans cette nouvelle classification, la famille des Punicacées n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des Lythracées, famille comportant 30 genres et 600 espèces (Spichiger *et al.*, 2004).

### 3. Répartition géographique :

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc. On le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée. De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique. Il est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride (Wald, 2009).



**Figure 03** : Répartition géographique de la grenade en Afrique (Source internet 2).

### 4. Propriétés thérapeutiques de *Punica granatum L* :

Les extraits d'écorce de grenade (péricarpe), obtenus à partir de solvants différents et testés sur six espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* et *Salmonella typhi*, ont montré une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Néanmoins, l'extrait méthanolique semble posséder une activité antibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *S. aureus* (Prashanth *et al.*, 2001).

La peau de grenade possède une activité fongistatique. En effet, elle est capable de bloquer la croissance, durant des périodes variées, de divers organismes fongiques telle que celle de *Penicillium citrinum* durant 8 jours, *Penicillium patulum* durant 4 jours, *Penicillium roquefortii* et *Aspergillus ochraceus* durant 3 jours (Azzouz et Bullerman, 1982).

#### **4.1. Activité antibactérienne :**

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

BRAGA *et al.*, (2005) ont montré l'intérêt de l'association de substances végétales aux traitements antibiotiques. L'extrait de grenade, peuvent permettre d'améliorer l'action antibactérienne de certains antibiotiques et lutter contre l'apparition de souches bactériennes résistantes aux traitements. AL-ZOREKY (2009) a démontré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Yersinia enterocolitica*.

PRASHANTH, (2001) a montré que L'écorce du fruit de *Punica granatum* possède, in vitro, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes.

En général l'action inhibitrice élevée de la grenade et de ses produits dérivés est attribuée à la présence de composés polyphénoliques à savoir les tanins et les anthocyanosides.

#### **4.2. Activité antioxydante :**

L'activité antioxydante in vitro de la grenade et de ses produits dérivés a été évaluée par plusieurs auteurs. TZULKER *et al.*, (2007) ont déterminé que la haute capacité antioxydante de la grenade et de ses produits dérivés est due à la présence des punicalagines dans sa composition, et non pas aux anthocyanosides.

D'autres études in vitro ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux (Basu *et al.*, 2009). Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (Seeram *et al.*, 2004).

MADRIGAL-CARBALLO *et al.*, (2009) ont suggéré que les composés phénoliques de la grenade éprouvent une réaction redox étant donné que les groupes hydroxyles des molécules phénoliques fournissent de l'hydrogène aux agents réducteurs. D'autres auteurs (Amarrowicz *et al.*, 2004) affirment que l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à son habileté pour attraper les radicaux libres et les cations métalliques chélates.

Les mécanismes de l'activité antioxydante *in vivo* ne sont pas clairs, mais les scientifiques savaient que ces mécanismes agissent sur les matrices biologiques d'une manière très complexe.

### **4.3. Activité anti-inflammatoires :**

Il y a de nombreuses preuves scientifiques qui démontrent clairement la propriété anti-inflammatoire de la grenade et de ses produits dérivés. Certains extraits de la grenade, notamment les pépins pressés à froid, inhibent l'action des enzymes cyclo-oxygénases et lipooxygénases *in vitro*. La cyclo-oxygénase est une enzyme très importante pour la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, qui sont des médiateurs importants de l'inflammation. La lipooxygénase conduit à la transformation de l'acide arachidonique en leucotriènes (Tomas-Barberan, 2010).

LEE *et al.*, (2010) ont analysé quatre tanins hydrosolubles, dont la punicalagine et la punicaline, toutes isolées de la grenade. Chacun de ces composés, à différentes doses, produit une inhibition spécifique de la production de monoxyde d'azote. De plus, LARROSA *et al.*, (2010) ont démontré que l'activité anti-inflammatoire de la grenade est due également à la présence d'acide ellagique qui contribue à la diminution des niveaux de prostaglandines.

### **4.4. Activité anticancéreuse :**

HONG *et al.*, (2008) ont démontré que le jus et les extraits provenant de la grenade constituent de puissants inhibiteurs de la croissance cellulaire et ils sont même plus puissants que certains polyphénols considérés de manière isolée ; cela suggère un effet synergique des phyto-chimiques présents dans la grenade et dans ses extraits. En effet, un extrait de grenade appliquée comme prétraitement topique diminue l'incidence d'une tumeur chez la souris de 100 à 30, augmentant en outre la latence dans le développement de la tumeur de 9 à 14 semaines (Afaq *et al.*, 2005).

En plus, des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont démontré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent

potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développement de la tumeur (Albrecht, 2004). Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l'apoptose (Malik, 2005).

D'après plusieurs recherches la grenade et ses dérivés, dû à leur composition phytochimique, sont des produits très recommandable pour la prévention et le traitement de plusieurs types de cancers à savoir le cancer de la prostate, du sein et du colon ainsi que d'autres (Wald, 2009).

#### **4.5. Activité antidiabétique :**

KATZ *et al.*, (2007) ont montré que l'extrait aqueux de peau de grenade était significativement hypoglycémique, en augmentant le taux d'insuline et le nombre de cellules  $\beta$  pancréatiques chez les rats diabétiques induits par l'alloxane. Cette étude suggère une application possible d'extrait de pelure de grenade pour le type 1 ainsi que le type 2 de la maladie du diabète.

En plus de l'effet de l'écorce de grenade sur le diabète, les fleurs du grenadier sont, depuis longtemps, reconnues par les médecines traditionnelles, pour leur action sur le diabète. C'est pourquoi, depuis quelques années, des études sont réalisées sur ces fleurs, afin de déterminer scientifiquement si elles possèdent de réels pouvoirs hypoglycémisants.

En effet JAFRI *et al.*, (2000) ont déterminé que l'extrait éthanolique de fleurs de grenadier a une réelle aptitude à faire baisser la glycémie en agissant sur la glycémie postprandial par un mécanisme similaire à l'acarbose (inhibiteur d'alphaglucosidases) et d'après la composition chimique des fleurs de grenadier, ils pensent que les principes actifs de ces extraits sont l'acide gallique et/ou l'acide asiatique.

Et pour le jus de grande, une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l'absorption et augmente l'excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL cholestérol en améliorant les ratios total/HDL et LDL/HDL cholestérol. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques (Esmailzadeh *et al.*, 2006) sans affecter les paramètres diabétiques (Rosenblat *et al.*, 2006).

#### **4.6. Activité antiulcéreuse :**

L'écorce de grenade séchée en poudre présente un efficace traitement contre l'acidité d'estomac et l'ulcère d'estomac (Championnière, 1850). L'extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol grâce à ses propriétés antioxydantes. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d'extrait hydroalcoolique de grenade (70% méthanol v/v), le pourcentage d'inhibition est respectivement de 22,37% et 74,21% pour les ulcères induits à l'aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l'éthanol (Ajaikumar *et al.*, 2005).

#### **4.7. Action cicatrisante :**

Comparé à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de peau de grenade (44% de composés phénoliques) à 5% permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de 10 jours, les rats traités au gel à l'extrait de peau de grenade sont guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins (Murphy, 2004). Les analyses par HPLC montrent que les composants majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (Murphy, 2004).

#### **4.8. Autres propriétés :**

Le jus de grenade stimule le foie et la rate. Il renforce la qualité et la quantité de sang, permettant de mieux nourrir les tissus. Il est très régénérant pour le cœur et le tissu reproducteur. Il est aussi très détoxifiant comme le jus de citron, mais sans acidité. Il donne de vitalité et stimule l'immunité physique et mentale (Geneviene, 2012).

L'écorce, les racines de l'arbre, et parfois mêmes les écorces du fruit, sont utilisées contre les parasites intestinaux, en particulier le vers solitaire (ténia) et la dysenterie amibienne. Elles contiennent des alcaloïdes, dont la pelletiérine, vermifuge efficace contre le ténia, inscrite au Codex de pharmacopée française depuis 1937 (Cutray *et al.*, 2008).

### **5. Composition chimique des différentes parties du fruit de *Punica granatum L* :**

Déjà au XIX<sup>ème</sup> siècle, le grenadier suscite un intérêt chez les chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre, tels que la pelletiérine. Grâce aux relativement récents procédés d'analyse chimique, comme les

techniques de chromatographie, de résonance magnétique ou encore de spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier avec précision la composition des différents organes du grenadier (Wald, 2009).

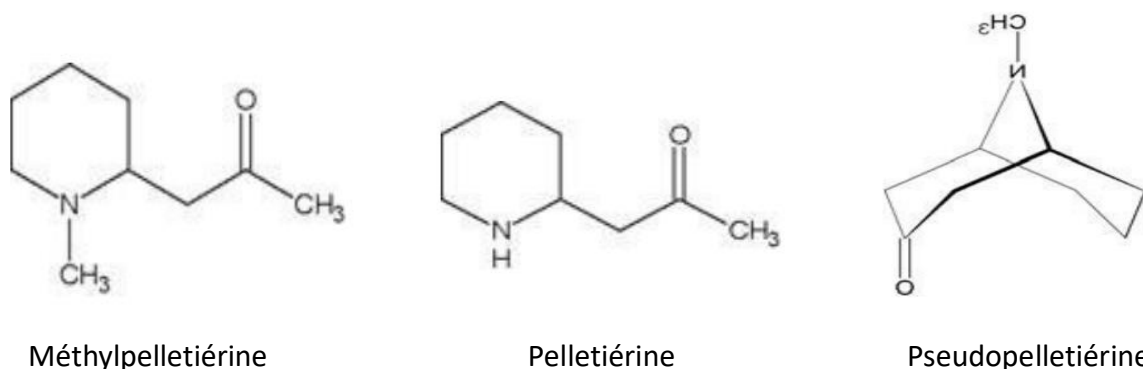
### 5.1. L'écorce de la racine :

L'écorce de la racine de grenadier a été analysée d'abord par Mitouart, en 1824, qui en a retiré une matière grasse assez abondante, des tanins, de l'acide gallique, une matière résineuse, de la mannite, du sucre et « du ligneux » (Cazin, 1868).

Puis LATOUR De TRIE, en 1831, trouve dans cette écorce de la chlorophylle, beaucoup de résine, des tanins, de la matière grasse, et une substance cristalline sucrée qu'il nomme « grenadine ». Cette dernière est blanche, sans odeur, cristallisée en choux-fleurs, et ne semble pas constituer le principe actif du végétal. Il sera montré par la suite que cette substance est simplement de la mannite (Cazin, 1868).

C'est en 1878 qu'un pharmacien français, Charles Tanret, découvre des alcaloïdes dans cette écorce, dont le principal qu'il appelle pelletiérine, et 3 autres, qu'il nomme isopelletiérine, pseudopelletiérine et méthylpelletiérine (Garnier et Bezanger-Beauquesne, 1961). En 1899, Piccinini ajoute à cette liste un cinquième alcaloïde liquide, isomère de la méthylpelletiérine, l'isométhylpelletiérine (Garnier et Bezanger-Beauquesne, 1961).

Ces alcaloïdes représentent environ 0,70% de l'écorce de racine du grenadier (Paris et Moyses, 1981). Plus récemment, l'analyse complète de cette écorce par des techniques modernes, met en évidence la présence d'ellagitanins tels que la punicaline, la punicalagine, les puniacortéines A, B, C et D, et la punigluconine, ainsi que des alcaloïdes pipéridiniques autres que la pelletiérine et ses dérivés (Lanskye et Newman, 2007).



**Figure 04** : Les alcaloïdes de l'écorce de racine du grenadier, mis en évidence par Charles Tanret (Lanskye et Newman, 2007).



## 5.2. L'écorce du tronc du grenadier :

L'écorce de l'arbre, ainsi que tous les autres organes du grenadier, hormis l'écorce de racine, n'ont presque pas été étudiés par les chercheurs du XIXème siècle. C'est seulement depuis quelques années, et avec des procédés modernes, que l'analyse chimique du grenadier dans son intégralité a été réalisée. Ainsi, l'écorce du grenadier se compose d'ellagitanins comme la punicaline, la punicalagine, la puniacortéine A, B, C et D, la punigluconine. Elle contient aussi des alcaloïdes tels que la pelletierine, la méthylpelletierine et la pseudopelletierine (Lanskye et Newman, 2007).

## 5.3. Les feuilles :



**Figure 05 :** Feuilles lancéolées de *Punica granatum L* (Wald, 2009).

Les feuilles du grenadier contiennent des flavones, telles que la lutéoline et l'apigénine. Cette dernière posséderait des propriétés anxiolytiques. Elles renferment également des tanins, comme la punicaline et la punicalagine (Lanskye et Newman, 2007).

## 5.4. Les fleurs :



**Figure 06 :** Fleurs aux sépales charnus et rouges et aux pétales froissés (Wald, 2009).

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique (Lanskye et Newman, 2007).

### 5.5. Le fruit :

Le fruit possède dans ses différentes parties de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée : écorce, membranes blanches, arilles et pépins.



**Figure 07** : La grenade et ses différentes parties (Calin Sanchez *et al.*, 2005).

#### 5.5.1. L'écorce de la grenade ou *malicorium* et la membrane blanche :

Environ 50% du poids total de la grenade correspond à l'écorce et aux membranes blanches, qui sont une source très importante de composés bioactifs tels les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitanins, les proantocianidines et les minéraux, essentiellement du potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium (Calin Sanchez *et al.*, 2005). C'est pourquoi les produits nutraceutiques et les condiments alimentaires élaborés à partir d'extraits d'écorce et de membranes blanches peuvent représenter une source importante de tous ces composés, s'ils ont été élaborés d'une manière correcte (Calin Sanchez *et al.*, 2005). L'écorce coriace et plutôt épaisse (2-3mm) rouge brillant elle est jaune dans certain variétés (QA international collectif, 1996). Il est riche en tanins hydrosolubles, principalement en punicaline, pédunculaine et punicalagine (Calin Sanchez *et al.*, 2005). Il peut reformées jusqu'à 28% des tanins (Fournier, 1948). L'écorce, riche en substances antimicrobiennes et antioxydantes, protège le fruit des prédateurs et des agressions du rayonnement solaire (Curtay *et al.*, 2008).

### 5.5.2. La partie comestible :

La partie comestible de la grenade représente environ 50% du poids total d'une grenade dont 80% sont les arilles (partie charnue) et 20% les pépins (partie ligneuse).

La composition des graines de grenade est la suivante : eau (85%) ; sucres (10%), principalement fructose et glucose ; acides organique (1,5%) essentiellement acide ascorbique, citrique et malique ; composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes (essentiellement les anthocyanines) (Calin Sanchez *et al.*, 2005).

En outre, les graines de grenade sont une source importante de lipide, car les pépins ont une teneur en acide gras qui oscille entre 12 et 20 % de leur poids total (poids sec) (Calin Sanchez *et al.*, 2005).

# Chapitre 2 :

## Les composés phénoliques

## **1. Généralités :**

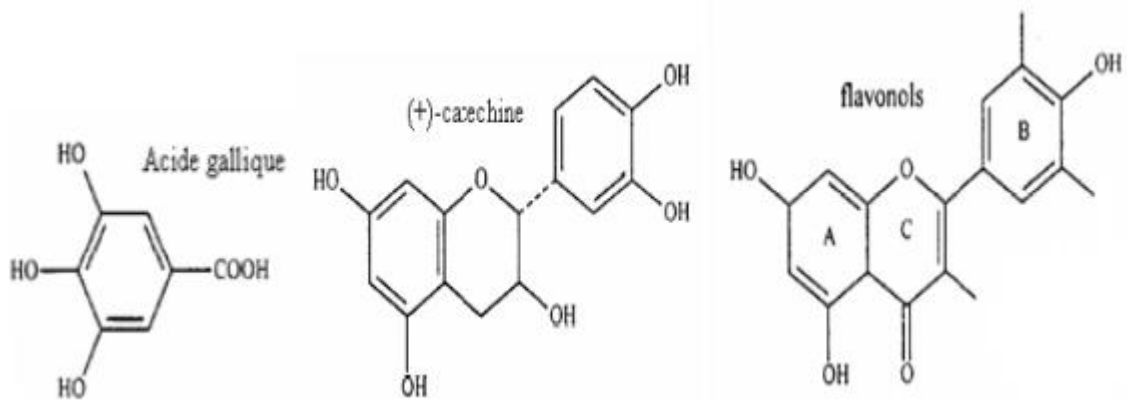
Les composés phénoliques (CP) (ou polyphénols) sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire. Les polyphénols constituent un groupe important de métabolites secondaires. La plupart des CP sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout de la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables selon les végétaux, à partir du préphénate (Guignard, 2000), ce dernier est formé par la voie de l'acide shikimique (Macheix *et al.*, 2005).

Les CP interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (Desjardins, 2008). Par exemple la lignine est un composé essentiel des plantes qui permet leur maintien et la conduction de l'eau (Macheix *et al.*, 2005). Les composés phénoliques contribuent également à la croissance et au développement de la plante par des actions diverses et variées. Ils interviennent par exemple dans le métabolisme et le transport de l'auxine (Treutter, 2006) et dans celui de l'éthylène (Vendrell, 2003). Les flavonoïdes conditionnent même la formation des grains de pollen chez le pétunia (Napoli *et al.*, 1999).

Il y a quatre principales familles de composés phénoliques : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Les composés phénoliques sont des éléments importants dans la qualité sensorielle (couleur et astringence) et nutritionnelle des végétaux : lutte contre certains cancers et possèdent une activité antioxydante (contre le vieillissement cellulaire).

## **2. Structure et catégories des composés phénoliques :**

Les composés phénoliques sont un groupe de produits naturels très diversifié et se subdivisent en plusieurs classes, qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base, ensuite par le degré de modification de ce squelette, enfin par liaison possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (Macheix *et al.*, 2005). Ils sont répartis en plusieurs classes, parmi elles : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.



**Figure 08** : Structure de quelques composés phénoliques (Wang et Mazza, 2002).

## 2.1. Polyphénols simples :

### 2.1.1. Acides phénoliques :

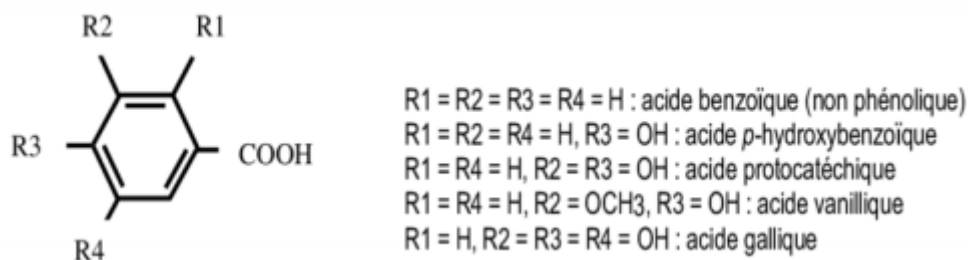
Le terme « acide phénolique » peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Bruneton, 1999). Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes sous forme libres ou liés. Ils se distinguent selon leur squelette de base, en deux principaux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinamiques (Ignat *et al.*, 2011 ; Garon et Gueguen, 2014).

#### 2.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques :

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, ils existent fréquemment sous forme d'ester ou de glucosides, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique (Macheix *et al.*, 2005).

##### ➤ Structure :

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure de base de type C6-C1, composé d'un noyau benzénique sur lequel s'attache une chaîne aliphatique à un carbone (figure 09) (Chira *et al.*, 2008).

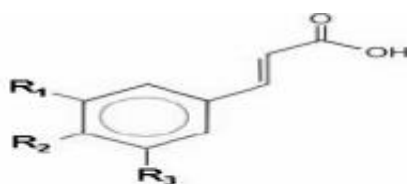


**Figure 09** : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Jakobek *et al.*, 2007).

### 2.1.1.2. Les acides hydroxycinamiques :

Les acides hydroxycinamiques dérivent de l'acide cinnamique, ce sont des composés aromatiques qui existent souvent sous forme combiné dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique (Macheix *et al.*, 2005).

#### ➤ Structure :



R<sub>2</sub> = OH: *p*-Coumaric acid  
 R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH: Caffeic acid  
 R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH : Ferulic acid  
 R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub> : Sinapic acid

**Figure 10** : Structures chimiques des acides hydroxycinamiques (Jakobek *et al.*, 2007).

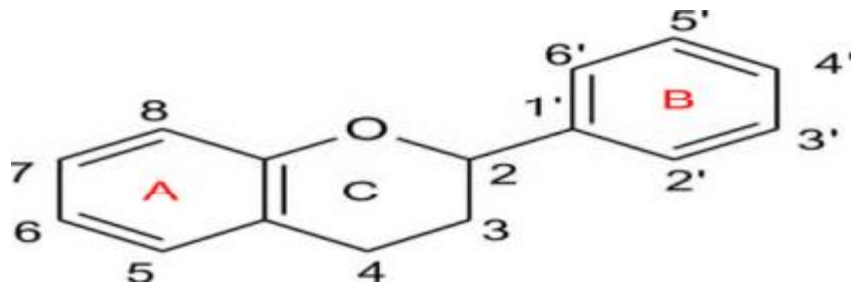
### 2.1.2. Les flavonoïdes :

Le terme « flavonoïdes » proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que ce terme a été plutôt prêté du *flavus* qui désigne jaune (Garon et Gueguen, 2014). Ils sont considérés comme des pigments responsables de la coloration des fleurs et des fruits des végétaux (Fleuriet *et al.*, 1996).

#### 2.1.2.1. Structure et classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont le groupe le plus connu de composés phénoliques d'origine biosynthétique mixte (Pietta, 2000), comprenant 15 atomes de carbone, formant une structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> constitué de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné (C) et ils existent sous forme simples ou glycosylés (Chira *et al.*, 2008). Du point de vue structural,

les flavonoïdes se répartissent principalement en trois familles: les flavonols, les flavanols et les anthocyanes; qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central (figure 11).



**Figure 11** : Structure de base des flavonoïdes (Pietta, 2000).

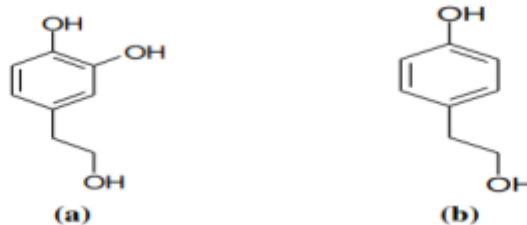
**Tableau 01** : Principales classes des flavonoïdes (Pietta, 2000).

Classe	Structure chimique
Flavonol	
Flavanol	
Anthocyane	



### 2.1.3. Alcools phénoliques :

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe (Eduardo, 1983).



**Figure 12** : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b) (Long *et al.*, 2010).

Les alcools phénoliques sont des composés phytochimiques phénoliques reconnus comme de puissants antioxydants polyphénoliques. Ces composés sont très abondants dans les olives, leur pulpe et les feuilles d'olivier qui contiennent davantage d'hydroxytyrosol que l'huile d'olive elle-même. Ils peuvent être libres ou associés à l'acide élénolique. Il est à noter que le principal alcool phénolique de l'olive (responsable de l'amertume du fruit) est l'oleuropéine (60 à 90 mg/g matière sèche) (Long *et al.*, 2010).

De nombreuses recherches ont démontré que l'action antioxydante de l'hydroxytyrosol est l'une des plus élevées chez les polyphénols, elle est même supérieure à celle de la vitamine E. Il est également connu pour ses propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques. Les alcools phénoliques sont considérés comme de très bon compléments et additifs alimentaires de la famille des conservateurs (Long *et al.*, 2010).

### 2.2. Polyphénols complexes (tannins) :

Les tanins sont des polyphénols que nous trouvons dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, grenade, datte, café, cacao,..). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (Hemingway, 1992). Les tanins sont divisés en deux groupes :

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

### 2.2.1. Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des esters du D- glucose et de l'acide gallique et ses dérivés (figure 9), ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique (Garon et Gueguen, 2014; Ribereau-Gayon, 1968).

➤ **Structure :**

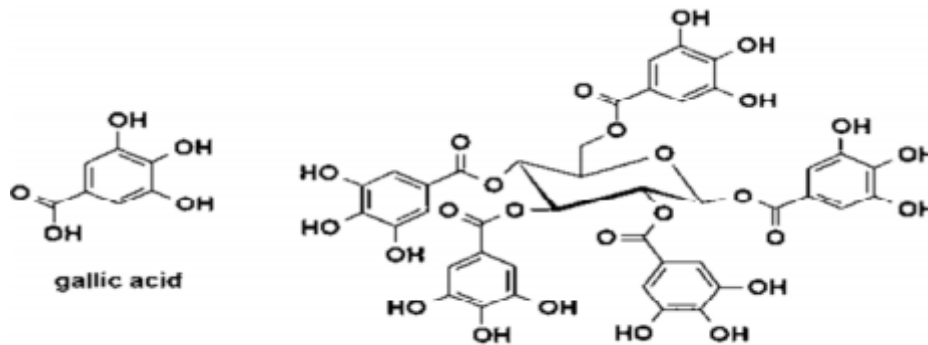


Figure 13 : Structure des tanins hydrolysables (Macheix *et al.*, 2005).

### 2.2.2. Tanins condensés :

Les tanins condensés, également nommés proanthocyanidines, sont des oligomères ou des polymères de Flavan-3-ols dérivés de la catéchine (figure 14), ils sont caractérisés par la résistance à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader (Garon et Gueguen, 2014).

➤ **Structure :**

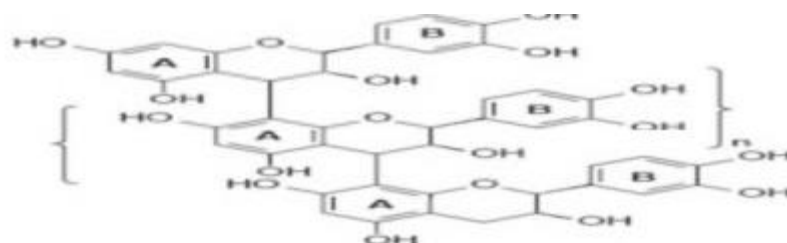


Figure 14 : Structure des tanins condensés (Macheix *et al.*, 2005).

### 3. Rôles et intérêts des composés phénoliques :

Des anciens travaux (Alibert *et al.*, 1977) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogénèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisations.

Les polyphénols sont parmi les métabolites qui possèdent des capacités antioxydantes importantes. Cette activité est due à leurs propriétés redox leur permettant d'adsorber et de neutraliser les radicaux libres et de piéger les espèces réactives d'oxygènes (Misirli *et al.*, 2001).

L'attaque de microbe pathogène telle que le virus, les bactéries, ou les mycètes induit une cascade de réaction qui peut mener à la résistance étant exprimée à l'emplacement de l'infection ou dans d'autres parties non infectées de la plante. Cette résistance systémique implique l'existence d'un signal endogène transféré de l'emplacement d'infection à d'autre partie de la plante. On pense que la première étape du mécanisme de la défense comporte une accumulation rapide des phénols à l'emplacement d'infection, qui fonctionnent pour ralentir la croissance du microbe pathogène (Misirli *et al.*, 2001).

Les mécanismes de l'action et de l'interaction, et les produits chimiques qu'ils contiennent demeurent dans la plupart indéterminés. Des chercheurs deviennent graduellement intéressés dans l'identification des principes actifs dans les extraits avec l'étude complémentaire intensive de leur mécanisme d'actions (Sun *et al.*, 2002).

# Partie expérimentale

## 1. Problématique :

L'usage des antibiotiques a pour objectif de maintenir les animaux en bonne santé et de contribuer à leur bien-être. Outils indispensables, ces médicaments permettent de contrôler le niveau sanitaire et d'assurer la qualité et la productivité dans les élevages. Mais, avec l'apparition des antibiorésistances suite à une utilisation abusive de ces molécules et qui sont potentiellement transmissibles à l'homme via la chaîne alimentaire ou par contact avec des bactéries résistantes ou via les mécanismes de transfert entre bactéries, il est devenu nécessaire de développer des alternatives naturelles telles les extraits de plantes naturelles et les huiles essentielles.

## 2. Objectif :

L'objectif de cette étude est de valoriser les extraits du fruit de *Punica granatum L*, en étudiant leurs compositions chimiques, puis évaluer in vitro l'activité antibactérienne de ces extraits sur des souches d'entérocoques multirésistantes d'origine aviaire.

## 3. Matériel et méthodes :

### 3.1. Extraction des composés phénoliques de la peau du fruit *Punica granatum L* :

#### 3.1.1. Préparation du matériel végétal :

La peau de *Punica granatum L* a été pelée manuellement et séchée à l'air libre dans un espace obscurité à température ambiante pendant 6 mois, puis transférés dans l'étuve à 40 °C pendant 24 heures pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et une meilleure extraction. Après séchage, la peau du fruit est broyée à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les particules ainsi obtenues sont tamisées sur un tamis de diamètres 100 µm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient et stocké à l'abri de lumière et de l'humidité jusqu'à l'extraction (figure 1).



Figure 15 : Préparation du matériel végétal.

### 3.1.2. Protocole d'extraction :

25g de matériel végétal broyées de manière à ce que la surface de contact avec le solvant (Eau distillée, Méthanol et Ethanol) soit la plus grande possible et donc le rendement d'extraction soit le meilleur possible sans que le temps d'extraction soit trop long, puis été macéré dans 250 ml du solvant et subi une agitation mécanique pendant 1 heure suivit d'une extraction dans un bain ultrasonique de marque « FRITSCH », pendant 2 heures . Les solutions ont été ensuite filtrées sur un papier filtre pour séparer le filtrat du marc. Celle-ci était réextraite avec 100 ml du solvant selon le même protocole pendant 1 heure. Finalement 50 ml pendant 30 mn, les trois fractions d'extraction ont été combinées dans un volume final de 400 ml .Le solvant a été évaporé (le méthanol et l'éthanol) par évaporation au rotavapeur à la température de 50°C ou déshydraté dans un lyophilisateur (48h à 72h). Les extraits obtenus ont été conservés à 4°C.

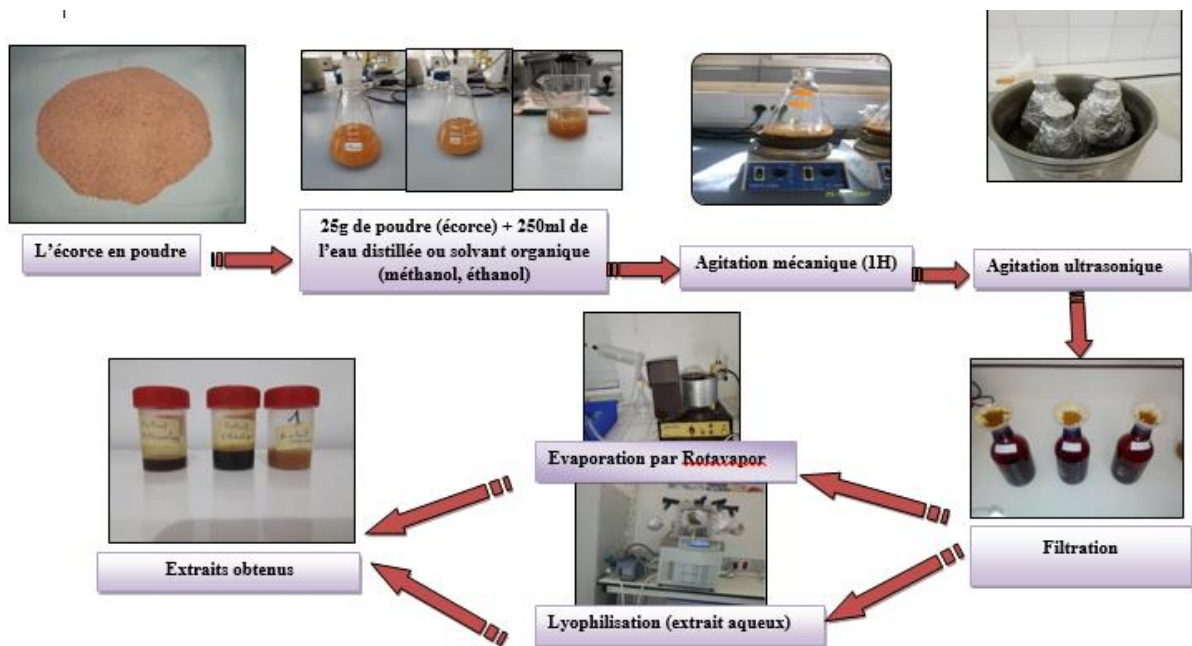


Figure 16 : Protocole expérimental de l'extraction des Polyphénols.

### 3.1.3. Identification des composés phénoliques par l'analyse de CLHP :

Les chromatogrammes ont été enregistrés et leur traitement a été exploité en utilisant le logiciel YL CLARITY. Les composés phénoliques sont identifiés à partir de leurs longueurs d'onde et de leurs temps de rétention. L'identification des composés phénoliques est effectuée en comparant les pics trouvés à des étalons de références bien déterminés.

### 3.2. Etude de l'activité antibactérienne (Aromatogramme):

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, il permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle ou de l'extrait naturel, par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de ceux-ci.

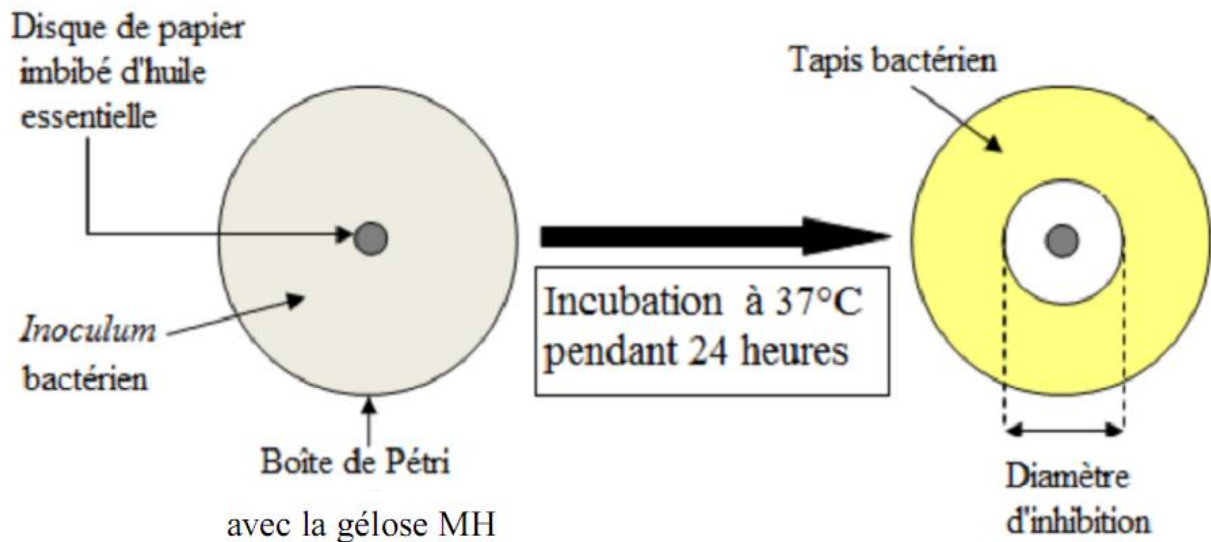


Figure 17: Illustration de la méthode d'aromatogramme (Zaiki, 1988).

#### 3.2.1. Souches bactériennes cibles:

L'activité antimicrobienne des extraits obtenus a été évaluée sur 02 souches d'entérocoques multirésistants, qui sont : *E. faecalis* et *E. faecium*.

Les caractéristiques et l'origine de ces souches sont reportées dans le tableau suivant.

Tableau 02 : Caractéristiques et origine des souches bactériennes cibles.

Souches testées	Type de résistance	Origine
<i>E. faecalis</i>	Tétracycline – Erythromycine – Pénicilline.	Poulet de chair
<i>E. faecium</i>	Tétracycline – Erythromycine – Pénicilline – Chloramphénicol.	Dinde

### 3.2.2. Milieux de culture :

Dans le but d'obtenir des colonies jeunes de 24h, les souches ont été repiquées sur une gélose nutritive.

Pour l'étude de l'activité antibactérienne, la gélose Mueller Hinton (IPA) a été utilisée.

### 3.2.3. Mode opératoire :

#### ➤ Préparation de la suspension bactérienne :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur le milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 McFarland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

#### ➤ Ensemencement :

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en tournant) sur la paroi du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée (Mueller Hinton), de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte à 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.

#### ➤ Imprégnation des disques :

Trois disques stériles de papier wattman de 6mm de diamètre sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur gélose et imprégnés de 10 µl de chaque extrait (l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et l'extrait éthanolique) et un quatrième disque d'antibiotique (Pénicilline 10UI) a été rajouté. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à l'étuve à température de 37°C pendant 18 à 24h.





**Figure 18 :** Extraits de fruit de *Punica granatum L.*



**Figure 19 :** Aromatogramme d'une souche d'entérocoque.

➤ Lecture :

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le milieu du disque. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque souche.

La lecture des résultats se fait par la mesure du  $\emptyset$  de la zone d'inhibition en mm selon la fourchette proposée par PONCE *et al.*, (2003) comme suit :

6 mm  $\leq \emptyset \leq$  8 mm : non sensible.

9mm  $\leq \emptyset \leq$  14 mm : sensible.

15 mm  $\leq \emptyset \leq$  19 mm : très sensible.

$\emptyset \geq 20$  mm : extrêmement sensible.

## 4. Résultats et discussion :

### 4.1. Identification des composés phénoliques:

Les chromatogrammes des trois extraits testés sont illustrés dans la figure 20 (a, b et c) et les molécules identifiées sont résumés dans le tableau 03.

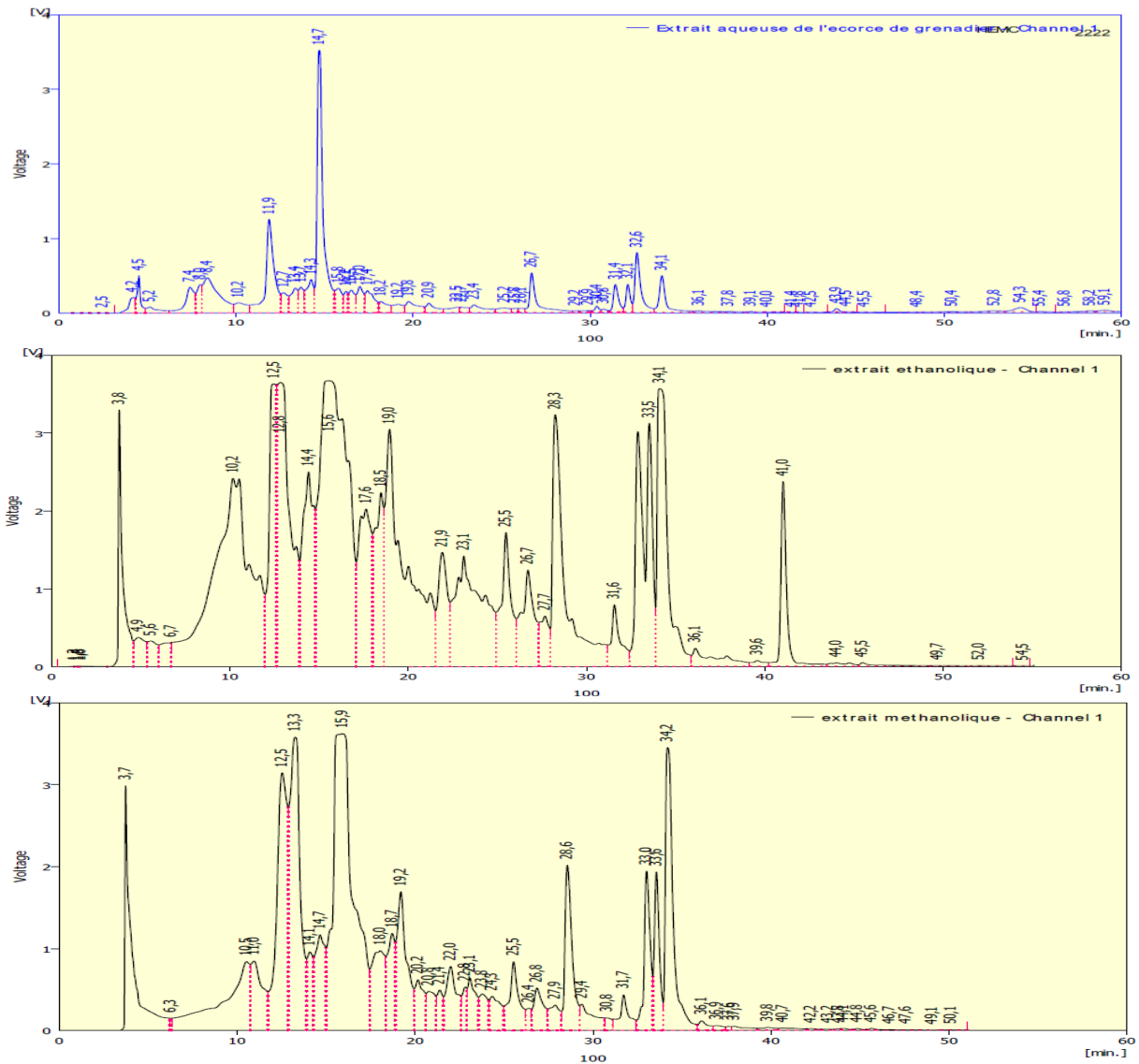


Figure 20 : Profil Chromatographique des extraits du fruit *Punica granatum L.*

**Tableau 03** : Les composés phénoliques identifiés dans les extraits du fruit *Punica granatum L.*

Extrait	Temps de rétention	La hauteur (mAU)	Surface du Pic (%)	Composé
<b>Extrait Aqueux (a)</b>	11,883	1255,354	10,90	Resorcinol
	22,490	70,765	00,90	Epicatchin
	22,743	70,771	00,60	Ac.vanillique
	25,173	61,242	00,80	Ac.transcinamic
	29,897	26,137	00,30	Berberine
	30,780	44,058	00,20	Ac .salicylique
	32,130	375,966	01,70	Euleropeine
<b>Extrait éthanolique (b)</b>	28,253	3235,007	06,10	Acide 3 hydroxy 4-metoxy cinamic
<b>Extrait méthanolique (c)</b>	22,003	782,354	02,20	Ac.Syringique
	29,373	321,557	01,10	Berberine
	30,797	152,666	00,30	Ac .salicylique
	33,010	1945,124	03,00	Ac.Manisique
	36,930	57,314	00,10	Quercitine
	29,373	321,557	01,10	Berberine

Les composés phénoliques présents dans les trois extraits étudiés étaient des flavonoïdes et des acides phénoliques. Spécifiquement on a identifié l'acide vanillinique et l'acide transcinamique et l'acide salicylique dans l'extrait aqueux.

En revanche nous avons trouvé l'acide syringique l'acide Manisique et l'acide salicylique dans l'extrait méthanolique. Alors que dans l'extrait éthanolique nous n'avons trouvé que l'acide 3-hydroxy-4-metoxy cinamique.

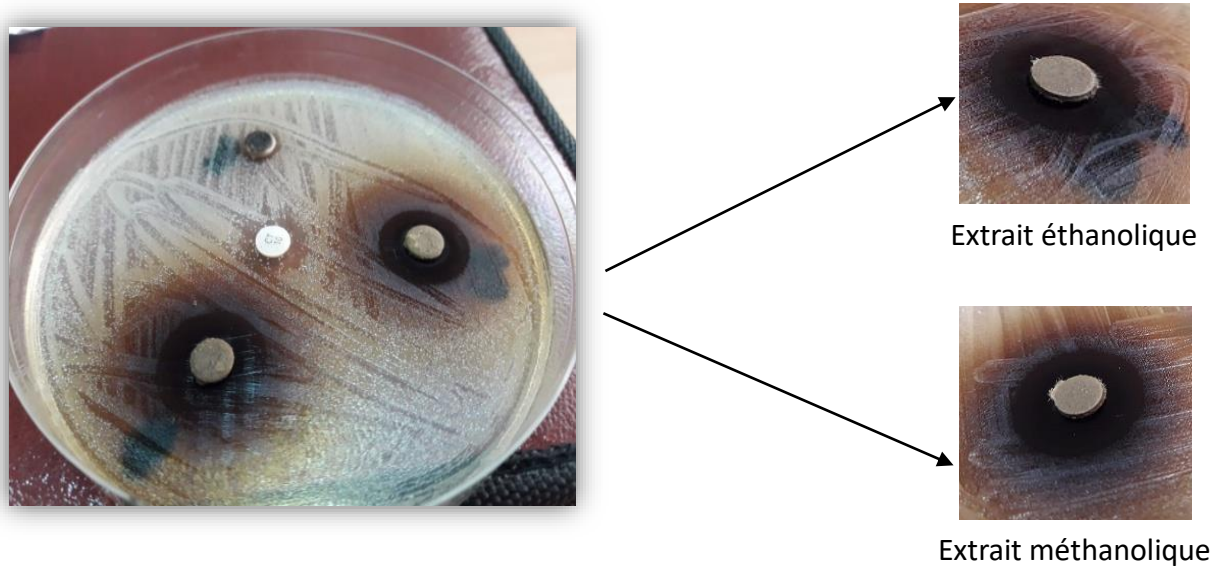
Les flavonoides identifiés sont la quercitine, la resorcinol, l'epicatechine et la berberine.

On a identifié aussi dans l'extrait aqueux l'oleuropeine un ortho-diphénol qui est très fréquemment identifié dans le fruit de l'olivier.

D'après plusieurs études, la majorité des Polyphénols des grenadiers se concentrent dans les écorces du fruit que les grains des fruits et que les fruits entiers. C'est-à-dire que les écorces des grenades contiennent plus de composés phénoliques (Fournier *et al.*, 1948 ; Lairini *et al.*, 2014 ; Zatoun et Ghanem, 2017).

#### 4.2. Résultats du test de sensibilité des souches testées aux extraits étudiés:

La figure 21 et 22 montre l'effet des extraits du fruit de *Punica granatum L* vis-à-vis des deux souches d'entérocoques étudiées.



**Figure 21 :** Aromatogramme de *E.faecium* après 24h d'incubation à 37°C.



**Figure 22 :** Aromatogramme de *E.faecalis* après 24h d'incubation à 37°C.

Le tableau suivant montre les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes aux extraits du fruit de *Punica granatum L*.

**Tableau 04** : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits du fruit de *Punica granatum L.*

Extraits du fruit de <i>Punica granatum L</i>	<i>E.faecalis</i>		<i>E.faecium</i>	
	Ø d'inhibition (mm)	Sensibilité	Ø d'inhibition (mm)	Sensibilité
Extrait aqueux (10µl)	-	/	-	/
Extrait éthanolique (10µl)	21,5±0.70	+++	13,5±0.64	+
Extrait méthanolique (10µl)	21±0.60	+++	13±0.62	+

- Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± Ecart type.

- Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres des zones d'inhibition.

Nos résultats montrent que *E.faecium* est sensible vis-à-vis de l'extrait éthanolique et l'extrait méthanolique avec des diamètres d'inhibition de 13,5mm et 13 mm respectivement, et *E.faecalis* est extrêmement sensible vis-à-vis des deux extraits avec des diamètres d'inhibition de 21,5mm et 21 mm.

Ces résultats corroborent ceux de REDDY *et al.*, (2007) qui ont démontré que des extraits de grenade présentent une activité antimicrobienne significative contre certaines bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Ceux de AL-ZOREKY (2009) qui a montré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*.

Cette activité antimicrobienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence des Polyphénols. Cela est confirmé par d'autres recherches qui ont attribué l'activité antimicrobienne à la présence des Polyphénols (King et Young, 1999).

Les résultats de sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait aqueux ont montré qu'il n'y avait pas d'effet antimicrobien, cela pourrait être du à une concentration insuffisante de l'extrait. En effet, CHOI *et al.*, (2009) ont étudié l'effet *in vivo* et *in vitro* de l'application de diverses concentrations d'extraits d'écorce de grenade pour inhiber la croissance de la Salmonelle, en constatant que la dose minimale était de 62,5 mg/l.

Les travaux de LAIRINI *et al.*, (2014) montrent que l'activité inhibitrice des germes commence à partir de 0,12mg/ml d'extrait, les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration en extrait.

Conclusion

## Conclusion

Le travail que nous avons entrepris porte sur l'étude chimique et l'activité antibactérienne des extraits de l'écorce de fruit de *Punica granatum L.*

La composition chimique a aboutit à l'identification de flavonoïdes et des acides phénoliques.

Le test d'activité antimicrobienne des deux extraits (éthanolique et méthanolique) s'est montré actif sur les germes étudiés. Toutefois, l'extrait aqueux n'a pas montré un effet antibactérien avec la concentration utilisée, il serait donc intéressant de déterminer les concentrations minimales à partir desquelles les extraits donnent des effets antibactériens (CMI).

Ainsi, ces résultats demeurent prometteurs, et pourraient servir de base pour des études cliniques ultérieures afin de confirmer l'efficacité antimicrobienne de ces produits naturels et de proposer leur utilisation en tant qu'agents antimicrobiens alternatifs, palliant aux effets secondaires des antibiotiques et aux résistances bactériennes accrues.

Ce travail nécessite d'être poursuivi pour les activités antibactérienne importantes de ces extraits, car le problème de la résistance bactérienne se pose de plus en plus ainsi que les effets négatifs sur la santé humaine des additifs de synthèse.

Il serait intéressant aussi de procéder à une analyse approfondie sur les extraits du fruit de *Punica granatum L.* afin d'isoler, de purifier et d'identifier les composés ayant une activité antibactérienne.

# Références bibliographiques



## Références bibliographiques

### A

- **Afaq F *et al.*, 2005:** Anthocyanin-and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer* Jan20;113(3):423-33.
- **Ajaikumar KB *et al.*, 2005.** The inhibition of astric mucosal injury by Punica granatum L. (pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol.* 4;96(1-2):171-6.
- **Albrecht M., Jiang W., Kumi-Diaka J., Lansky EP., Gommersall LM et Patel A. 2004.** Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food.* 2004 Fall;7(3):274-83.
- **Alibert G., Ranjeva R., et Boudet M.A., 1977.** Organisation subcellulaire des voies de synthese de composés phenoliques. *Veg.*, Vol. 15, p.p. 279-301.
- **AL-zorky N.S. 2009.** Antimicrobial activity of pomegranate (*Punicagranatum L.*) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 244-248.
- **Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B and Weil J.A. 2004.** Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- **Azzouz M. A., Bullerman L. B. 1982.** Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of food protection*; 45: 1248-1301.

### B

- **Basu A., Penugonda K. 2009.** Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev.*67(1):49-56.
- **Braga L.C., Shupp J.W., Cummings C., Jett M., Takahashi J.A., Carmo L.S., Chartone-Souza E et Nascimento A.M. 2005.** Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal Ethnopharmacol*, 96, 335-339.
- **Bruneton J. 1999.** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales.* Paris : Technique et Documentation-lavoisier, 3 ème édition. 1120 p.

## C

- **Calin Sanchez Angel et Carboneli Banaching Angel A. 2005.** La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.
- **Cazin F.J. 1868.** Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées. De l'envol (EDS) 1189 p.
- **Championnière Just Lucas. 1850.** Journal de médecine et de chirurgie pratique: à l'usage des mediciens praticiens. Imprimerie de Crapelet (EDS), Paris, 21p
- **Chira K., Suh J., Saucier C and Teissède P. 2008.** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6:75-82.
- **Choi, JG., Kang, OH., Lee, YS., Chae, HS., Oh, YC., Brice, OO., Kim, MS., Sohn, DH., Kim, HS., Park, H., Shin, DW., Rho ,JR y., Kwon, DY. 2009.** *Evid Based Compl Alter Med* 17, 1–8.
- **Curtay, J.P., Jacob, L., Jung, R.R., et Kaplan, M. 2008.** Jus de grenade fermenté, la grenade, "aliment-plus" un nouvel outil puissamment cardiovasculaire et anti-cancer dans l'arsenal de la nutrithérapie. Macro pietteur (EDS), Paris, 73p.

## D

- **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.

## E

- **Eduardo D. P. De Robertis., E. M. F. De Robertis. 1983.** *Biologie cellulaire et moléculaire*.
- **Esmailzadeh A., Tahbaz F., Gaieni I., Alavi-Majd H et Azadbakht L. 2006.** Cholesterollowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Int J Vitam Nutr Res.* 2006 May;76(3):147-51.

**F**

- **Fleuriet A., Uhel C and Dedaldechamp F. 1996.** Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme. *Acta Botanica Gallica*, 143(6): 493- 500.
- **Fournier P. 1948.** Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tome II. Paul Lechevalier (EDS), 504 p.

**G**

- **Garnier G et Bezanger-Beauquesne L. 1961.** Ressources médicinales de la flore française. Tome II. Vigot Frères (EDS). 1511p.
- **Garon D and Guéguen J.C. 2014.** Biodiversité et évolution du monde végétal. France : EDP Sciences. 289 p.
- **Geneviene Martin. 2012.** Se soigner avec les jus frais selon l'Ayreda. Revue électronique n°143. *Alternative* (EDS), 3p.
- **Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R et al. 2005.** Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study *Lancet* 365: 579–87.
- **Guignard, J.L., Potier, P., 2000.** Biochimie Végétale. Dunod. Paris.

**H**

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

**I**

- **Ignat I., Volf I and Popa V.I. 2011.** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126: 1821-1835.

**J**

- **Jackobek L., Šeruga M., Novak I and Medvidovic-Kosanovic M. 2007.** Flavonols, Phenolic acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 103: 369-378.

- **Jafri MA., Aslam M., Javed K et Singh S. 2000.** Effect of Punicagranatum Linn. (Flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 309-314.

## K

- **KatzS R., NewmanR.A et LanskyE.P. 2007.** Punicagranatum: heuristic treatment for diabetes mellitus. *Journal Medicine Food*, 10(2), 213–217.
- **King, A et Young G. 1999.** *Journal of the American dietetic association*, 99 213-218.

## L

- **Lansky E. P et Newman R. A. 2007.** Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*. N°109. Pages 177-206.
- **Lairini, R. Bouslamti , F. Zerrouq et A. Farah, 2014.** Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de Punica granatum par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (S1) 2314-2318.
- **Larrosa M., González-Sarrías A., Yáñez-Gascón MJ., SelmaMV., Azorín-ORTUÑO M., TotiS., Tomás-BarberánF., DolarP Y et EspínJC. 2010.** Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its métaboliteuroolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nut Biochem* 21(8): 717–725.
- **Lee CJ., Chen LG et Liang WLY Wanga C C. 2010.** Anti-inflammatory effects of PunicagranatumLinne in vitro and in vivo. *Food Chem* 118: 315–322.
- **Long H.S., Tilney P.M. et Van Wyk B.-E. 2010.** The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae). *South African Journal of Botany*.

## M

- **Macheix J.J., Fleuriet A et Jay-Allemand, C. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 192 p.
- **Madrigal-Carballo S., Rodriguez G., Krueger C.G., Dreher M. et Reed JD. 2009.** Pomegranate (*Punicagranatum* L.) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal Funtional Foods*, 1, 324-329.

- **Malik A., Afaq F., Sarfaraz S., Adhami VM., Syed DN et Mukhtar H. 2005.** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 11;102(41):14813-8.
- **Misirli A., kûden A., Demir G et Gûlcan R. 2001.** Determination of phenolic compounds in some almond hybrids varying in resistance to *pseudomonas amygdali*. In : 11<sup>ème</sup> colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier. Zaragoza. CIHEAM-IAMZ, p.p. 71-86.
- **Murphy KN. 2004.** Study on wound healing activity of Punica granatum peel. J Med Food. 2004 Summer;7(2):256-9.

## N

- **Napoli C.A., Fahy D., Wang H.Y et Taylor L.P. 1999.** White anther: A petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility and is complemented by a chalcone synthase transgene. Plant Physiology. 120 (2), 615-622.

## P

- **Pantuck A.J., Leppert J.T., Zomorodian N., Aronson W., Hong J et Barnard RJ. 2006.** Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. Clin Cancer Res. 2006 Jul 1;12(13):4018-26.
- **PARIS R.R et MOYSE H. 1981.** Matière médicale. Collection de précis de pharmacie. 2<sup>o</sup> édition. Tome II. Masson (EDS), 518 p.
- **Pietta P.G. 2000.** Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Production, 63: 1035-1042.
- **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E. & Roura S.I., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 36: 679-684.
- **Prashanth D et Asha M.K. 2001.** Antibacterial activity of Punica granatum. Fitoterapia. 2001. N°72. Pages 171-173.

## Q

- **QA internatonal collectif. 1996.** L'encyclopédie visuelle des aliments .livre. Quebec-Amerique (EDS), Singapour, 685p.

## **R**

- **Reddy , MK., Gupta, SK., Jacob ,MR., Khan ,SI y., Ferreira, D. 2007.** Planta Med 73 461–467.
- **Rosenblat M., Hayek T et Aviram M. 2006.** Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. Atherosclerosis. 2006 Aug;187(2):363-71.

## **S**

- **Schubert SY., Lansky EP et Neeman I. 1999.** Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J Ethnopharmacol; 66(1): 11-7.
- **Seeram NP., Lee R et Heber D. 2004.** Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. Clin Chim Acta;348(1-2):63-8.
- **Spichiger R.E., Savolainen V et al., 2004.** Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Editions Presses polytechniques et universitaires romandes. Troisième édition. 413 pages.
- **Sun J., Khtan B., Huang S-H., Whiteman M et Zhu Y-Z. 2002.** Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. Acta Pharmacol, Vol. 23, n.12, p.p. 1142-1151.

## **T**

- **Tomas-Barberan FA, 2010.** Granada y salud: Aspectosfarmacológicos y terapéuticos de la granada. En: I Jornadasnacionalesobre el granado, 7-27 Octubre 2010, Elche, España (CD-ROM).
- **Treutter D, 2006.** Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environ. Chem. Letter. 4, 147-157.

- **Tzulker R., Glazer I., Bar-Ilan I., Holland D., Aviram M et Amir R. 2007.** Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 55, 9559-9570.

## V

- **Vendrell M. 2003.** Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene. IOS Press: 235-236.

## W

- **Wald Elodie, 2009.** Le grenadier *Punica granatum* : Plante historique et évolution thérapeutique récentes. Université Henri Poincaré. Thèse. 158p.

## Z

- **Zaika L.L. 1988.** Spices and Herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J of Food Safety*. 9, 97-117.
- **Zatoun, S et Ghanem, K. 2017.** Etude quantitative et activité antioxydante du *Punica granatum*, Mémoire Master, Université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued.

### Sources internet :

- **Source internet 1 :** [https://fr.wikipedia.org/wiki/Grenadier\\_commun](https://fr.wikipedia.org/wiki/Grenadier_commun)
- **Source internet 2 :** <http://www.tela-botanica.org/eflore/BDAFN/0/n/148716/chorologie>